

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**MILENE PEREIRA MOREIRA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS A  
PARTIR DE CULTIVO *IN VITRO* DE LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA DE  
MAMA HUMANA**

**Belo Horizonte  
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MILENE PEREIRA MOREIRA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS A  
PARTIR DE CULTIVO *IN VITRO* DE LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA DE  
MAMA HUMANA**

**Belo Horizonte  
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**MILENE PEREIRA MOREIRA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS A  
PARTIR DE CULTIVO *IN VITRO* DE LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA DE  
MAMA HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Investigativa

**Orientadora:** Dra. Luciana Maria Silva

**Co-orientador:** Dr. Geovanni Dantas Cassali

**Belo Horizonte**

**2013**

Moreira, Milene Pereira.  
M838i Isolamento e caracterização de células-tronco/progenitoras a partir de cultivo in vitro de linhagens celulares de carcinoma de mama humana [manuscrito]. / Milene Pereira Moreira. - - Belo Horizonte: 2013.  
114f.: il.  
Orientadora: Luciana Maria Silva.  
Co-Orientador: Geovanni Dantas Cassali.  
Área de concentração: Patologia Investigativa.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias da Mama. 2. Células -Tronco Neoplásicas. 3. Técnicas de Cultura. 4. Linhagem Celular. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Silva, Luciana Maria. II. Cassali, Geovanni Dantas. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 200

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Para conquistar coisas importantes, devemos não apenas agir, mas também sonhar, não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e por tornarem tudo possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder força, perseverança e saúde em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais e minhas irmãs, pelo amor incondicional, apoio constante e por sempre acreditarem em mim.

Ao Marcos, meu noivo e grande amigo, pelo amor, companheirismo, paciência e palavras de incentivo.

A minha orientadora, Dra. Luciana Maria Silva, pela confiança, carinho e dedicação durante todos esses anos de convivência. Por todos os ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo. Não tenho palavras para agradecer tudo que você fez e ainda faz por mim. Muito mais que uma orientadora, uma amiga!

Ao meu co-orientador, Dr. Geovanni Cassali, pela confiança e oportunidade concedida a mim e a Luciana e pela presteza em ajudar-me sempre que precisei.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Celular, Heloísa, Letícia, Camila, Graziela, Tayara, Mariana, Rita, Aristeu, Fábio, Alexia, Raquel e todos os ex-membros pela agradável convivência e trocas de experiência. Em especial, a Josi e Aline pelo apoio e ajuda na reta final do mestrado.

À Flávia Perrim, amiga querida, muito obrigada pelos momentos de descontração e por sempre me ajudar quando precisei.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Comparada do ICB por sempre me receberem tão bem.

Aos coordenadores, professores e à secretária do programa de Pós-graduação em Patologia, meus sinceros agradecimentos.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO .....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1 Câncer de mama.....	20
1.2 Marcadores moleculares .....	22
1.3 Células-tronco do câncer.....	25
1.4 Cultura tridimensional .....	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral .....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Cultivo Celular .....	34
3.1.1 Linhagens celulares humanas .....	34
3.1.2 Células-tronco/progenitoras.....	34
3.1.3 Cultura tridimensional.....	34
3.2 Caracterização celular por microscopia óptica .....	35
3.2.1 Imunofluorescência.....	35
3.2.2 Fluorescência .....	35
3.3 Caracterização celular por citometria de fluxo.....	36
3.4 Análise do perfil de expressão gênica .....	37

3.4.1 Extração de RNA total .....	37
3.4.1.1 Cultivo 2D.....	37
3.4.1.2 Cultivo 3D.....	37
3.4.2 Síntese de cDNA.....	37
3.4.3 Análise do perfil de expressão gênica.....	37
3.5 Análise do perfil de expressão proteica.....	38
3.6 Análise estatística .....	39
4. OTIMIZAÇÃO DOS ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DAS CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS E DOS ENSAIOS DE qRT-PCR PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	41
4.1 Otimização do cultivo das células-tronco/progenitoras.....	41
4.2 Otimização da concentração dos iniciadores para os genes alvos por qRT-PCR.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 Artigo 1.....	56
5.2 Artigo 2.....	75
6. RESULTADOS ADICIONAIS.....	98
6.1 Análise de genes de referência.....	98
6.2 Análise de expressão proteica .....	101
7. CONCLUSÕES .....	102
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	103
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104
10. ANEXOS .....	112
Anexo 1 - Comprovação de submissão de artigo.....	112
Anexo 2 - Declaração de aprovação.....	113
Anexo 3 - Ata da defesa.....	114

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não-melanoma.....	21
Figura 2 - Anatomia da mama humana .....	22
Figura 3 - Modelo de heterogeneidade das CSC`s .....	27
Figura 4 - Otimização do cultivo das mamoesferas-derivadas obtidas a partir da linhagem celular BT-549 em cultura 2D por quatro dias .....	43
Figura 5 - Cultivo da linhagem celular BT-549 em Matrigel™ utilizando meios de diferenciação (formação) das mamoesferas por três dias .....	44
Figura 6 - Cultivo em 3D das mamoesferas obtidas a partir das linhagens celulares BT-549 e Hs 578T cultivadas em meio DMEM/F-12 sem suplementação.....	45
Figura 7 - Cultivo em 3D das mamoesferas obtidas a partir das linhagens celulares BT-549 e Hs 578T cultivadas em meio de DMEM/F-12 suplementado com 20ng/mL de EGF, 10µg/mL de insulina bovina, 2% de soro de cavalo e 0,5µg/mL de hidrocortisona.....	46
Figura 8 - Otimização da concentração dos iniciadores do gene <i>ERBB2</i> por qRT-PCR.....	49
Figura 9 - Otimização da concentração dos iniciadores do gene <i>KRT5</i> por qRT-PCR .....	50
Figura 10 - Otimização da concentração dos iniciadores do gene <i>MKI67</i> por qRT-PCR.....	51
Figura 11 - Otimização da concentração dos iniciadores do gene <i>TP63</i> por qRT-PCR.....	52
Figura 12 - Otimização da concentração dos iniciadores do gene <i>CDH3</i> por qRT-PCR.....	53
Figura 13 - Análise da expressão de genes de referência nas linhagens celulares BT-549, Hs 578T e nas mamoesferas-derivadas. ....	98
Figura 14 - Média da estabilidade da expressão gênica determinada pelo programa <i>GeNorm</i> ..	100
Figura 15 - Padrão eletroforético das proteínas isoladas das linhagens celulares, das mamoesferas-derivadas e das mamoesferas cultivadas em 3D em gel de poli-acrilamida 15% corado com azul de comassie.....	101

**ARTIGO 1**

Figure 1 - BT-549 and Hs 578T cell lines growing in 2D culture .....	61
Figure 2 - BT-549 and Hs 578T cell lines in 3D culture (Matrigel™) .....	63
Figure 3 - Relative gene expression of BT-549 and Hs 578T cell lines in 3D culture .....	65

**ARTIGO 2**

Figure 1 - Mammospheres-derived from BT-549 and Hs 578T cell lines. ....	82
Figure 2 - Mammospheres BT-549 and Hs 578T cultured in Matrigel™ for three days.....	83
Figure 3 - Immunophenotype of BT-549 and Hs 578T cell lines according to mesenchymal stem cell classification and CSC markers. ....	84
Figure 4 - Relative gene expression levels of the genes <i>ERBB2</i> , <i>KRT5</i> , <i>MKI67</i> , <i>CDH3</i> and <i>TP63</i> in the mammospheres-derived BT-549 and Hs 578T compared with the respectively parental cell lines grow in monolayer (2D) .....	85
Figure 5 - Relative gene expression levels of the genes <i>ERBB2</i> , <i>KRT5</i> , <i>MKI67</i> and <i>CDH3</i> in the mammosphere BT-549 and Hs 578T cultured in 3D .....	86

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Marcadores para citometria de fluxo. ....	36
Tabela 2 - Sequências dos iniciadores utilizados nas qRT-PCR. ....	40
Tabela 3 - Suplementação de meios de cultivo para ensaios de obtenção de mamoesferas. ....	42
Tabela 4 - Concentrações otimizadas dos iniciadores e o perfil térmico das reações de qRT-PCR .....	54
Tabela 5 - Estabilidade da expressão gênica entre os grupos avaliados pelo <i>GeNorm</i> .....	99

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ALAS1 – gene aminolevulinato delta-sintase 1

ALDH – enzima aldeído desidrogenase

ATCC – *American Type Culture Collection*

2D – bidimensional

B2M – gene  $\beta$ -2-microglobulina

BSA – albumina de soro bovina

BRCA – gene do câncer de mama (Breast cancer gene)

CSC – células-tronco do câncer

CD - *cluster* de diferenciação

CDH3 – gene P-caderina

cDNA – DNA complementar

Ct – ciclo de *Threshold*

CXCR4 - receptor de quimiocina (C-X-C motif) 4

DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindol

DNA – ácido desoxirribonucleico

$\Delta\Delta$ Ct – delta, delta Ct

E-caderina – proteína E(epitelial)-caderina

EGF – fator de crescimento epidérmico

EHS – tumor *Engelbreth-Holm-Swarm*

ERBB2 - gene receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2

ESR1 – gene receptor de estrógeno

FGF – fator de crescimento fibroblástico

FW – iniciador *Forward*

G6PD – gene glucose-6-fosfato desidrogenase

HER-2 – proteína receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 codificada pelo gene ERBB2

HPRT1 – gene hipoxantina fosforibosil transferase 1

IPO8 – gene importina 8

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Ki-67 – proteína nuclear codificada pelo gene MKI67

KRT5 – gene queratina 5

MKI67 – gene antígeno identificado por anticorpo monoclonal

N-caderina – proteína N(neuronal)-caderina

PBS – solução salina de fosfato

PBT – PBS com Triton X-100

P-caderina – proteína P (placentária)-caderina codificada pelo gene CDH3

PGR – gene receptor de progesterona

PPIA – gene peptidilprolil isomerase A (ciclofina A)

p53 – proteína tumoral p53

p63 – proteína tumoral p63 codificada pelo gene TP63

qRT-PCR – reação da polimerase em cadeia (PCR) quantitativo em tempo real

R-caderina – proteína R(retina)-caderina

RE – proteína receptor de estrógeno codificado pelo gene ESR1

RNA – ácido ribonucleico

RN18S1 – gene unidade ribossomal 18S

RV – iniciador *Reverse*

SDHA – gene complexo succinato dehidrogenase, subunidade A

SERM – moduladores seletivos dos receptores estrogênicos

SFB – soro fetal bovino

TBP – gene de ligação TATA box

TDLV – unidade ducto lobular terminal

TP63 – gene proteína tumoral p63

Transportadores ABC – proteína de membrana transportadores *ATP-binding cassette* (ABC)

3D – tridimensional

WHO – World Health Organization

## RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. É um grupo heterogêneo de neoplasias, possivelmente devido à existência de uma pequena subpopulação de células nesses tumores com propriedades de células-tronco, denominadas células-tronco do câncer (CSC's). A teoria da CSC's propõe uma organização hierárquica de células dentro do tumor, em que as CSC's são responsáveis por sustentar o crescimento do tumor, pela resistência do tumor a terapias convencionais e recorrência da doença. Células com características funcionais de células-tronco/progenitoras podem ser isoladas de células mamárias e propagadas *in vitro* como esferas não aderentes, denominadas mamoesferas. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo caracterizar linhagens celulares humanas de carcinoma de mama BT-549 e Hs 578T, mamoesferas-derivadas obtidas a partir delas cultivadas *in vitro* em substratos plásticos (2D) e em sistema tridimensional (Matrigel™). Para isso foi feita caracterização por microscopia óptica (Faloidina/DAPI, Image it™,  $\alpha$ -tubulina, E-caderina e VE-caderina) e por citometria de fluxo (CD90, CD146, CD105, CD31, CD34, CD45 e CD24) e, análise do perfil de expressão por qRT-PCR dos genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* e *TP63*. Os resultados obtidos mostram que ambas as linhagens celulares cultivadas em 2D e em 3D, expressam  $\alpha$ -tubulina, com exceção da linhagem Hs 578T cultivada em 3D, e não expressão E-caderina e VE-caderina. A imunofenotipagem classificou a linhagem BT-549 como CD90<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> e a linhagem Hs 578T como CD90<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup>. As linhagens celulares cultivadas em Matrigel™ formaram estruturas tridimensionais e apresentaram uma expressão diferencial dos genes analisados em comparação com as linhagens cultivadas em 2D. Sob condições indiferenciadas essas células formaram mamoesferas-derivadas, sendo que a linhagem celular BT-549 apresentou melhor resultado. As mamoesferas-derivadas e as mamoesferas cultivadas em 3D apresentaram expressão de  $\alpha$ -tubulina e ausência de expressão de E-caderina e VE-caderina. A análise de expressão gênica mostrou que as mamoesferas-derivadas apresentam expressão diferencial dos genes estudados quando comparadas as linhagens parentais, sugerindo indícios da participação desses genes na formação das mamoesferas. Em cultivo 3D, as mamoesferas



parecem sofrer diferenciação e apresentam uma expressão diferencial dos genes analisados em relação às mamoesferas-derivadas das linhagens celulares. Com base nos nossos resultados, a BT-549 parece ser um bom modelo de estudo *in vitro* das CSC's, sendo os genes ERBB2 e TP63 potenciais marcadores para as CSC's.

Palavras-chave: câncer de mama, células-tronco do câncer, cultura tridimensional, linhagem celular, mamoesferas.

## ABSTRACT

Breast cancer is the second most common type of cancer worldwide and the most common among women. It is a heterogeneous disease, possibly due to the existence of a small population of cells in these tumors with stem cell properties, known as cancer stem cells (CSC's). The CSC's hypothesis proposes a hierarchical organization of cells within the tumor where only the CSC's has the ability of sustain tumor growth, resistance to conventional therapies and disease recurrence. Cells with function characteristic of progenitor/stem cell can be prospectively isolated and propagated *in vitro* as non-adherent spheres, termed mammospheres. Therefore, this study aimed to characterize human cell lines of breast carcinoma BT-549 and Hs 578T, mammospheres-derived from the cell lines cultured *in vitro* in plastic substrate and in three-dimensional system (Matrigel™). For this was made characterization by optical microscopy (Phalloidin/DAPI, Image it™,  $\alpha$ -tubulin, E-cadherin and VE-cadherin) and by flow cytometry (CD90, CD146, CD105, CD31, CD34, CD45 e CD24) and, analysis of expression profile by qRT-PCR of the genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* e *TP63*. The results obtained showed that both cell lines cultured in 2D and in 3D, express  $\alpha$ -tubulin, with the exception of Hs 578T cell line cultured in 3D, and do not express E-cadherin and VE-cadherin. The immunophenotype classified the BT-549 cell line as CD90<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> and the Hs 578T cell line as CD90<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup>. Both cell lines cultured in Matrigel™ can form three-dimensional structures and presented a differentiated expression of the genes analyzed when compared with the cell lines cultured in 2D. Under undifferentiating conditions these cell lines form mammospheres-derived, being that the cell line BT-549 demonstrated a better result. The mammospheres-derived and the mammosphere cultured in 3D showed expression of  $\alpha$ -tubulin and no expression of E-cadherin and VE-cadherin. The gene expression analysis showed that the mammosphere-derived presented a differentiated expression of the genes studied when compared with the parental cell lines, suggesting cues of the participation of these genes in the formation of mammospheres. In 3D culture the mammospheres seems undergoes differentiation and presented a differentiated expression of the genes analyzed compared with the mammosphere-

derived from the cell lines. Based in our results, the cell line BT-549 look like a good model to study *in vitro* the CSC's, being the genes *ERBB2* and *TP63* potential markers of CSC's.

Keywords: breast cancer, cancer stem cell, three-dimensional culture, cell line, mammospheres.

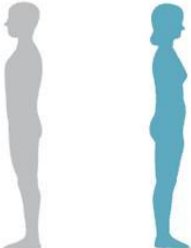
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer de mama

O câncer se caracteriza por um crescimento celular anormal e desordenado que persiste mesmo após a suspensão do evento inicial da transformação maligna resistindo aos eventos reguladores da proliferação celular, como apoptose (IGNEY e KRAMMER, 2002). A Organização Mundial de Saúde (WHO) classifica o câncer no grupo de doenças não transmissíveis, juntamente com doenças cardíacas, infarto, doenças respiratórias crônicas e diabetes. Esse grupo é a principal causa de morte no mundo (WHO, 2010). Em 2008, 7.6 milhões de pessoas morreram de câncer, das 12.7 milhões de pessoas que foram acometidas com essa doença (GLOBOCAN, 2008). No mundo estima-se que 1.638.910 de pessoas serão diagnosticadas com algum tipo de câncer em 2012 e dessas, 577.190 chegaram a óbito (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012). Dados da American Cancer Society estimam para 2013 nos Estados Unidos, 296.980 novos casos, sendo que 39.620 mulheres irão a óbito. No Brasil, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte, sendo estimados para o Brasil em 2012, 518.510 novos casos de câncer.

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Ele está entre os dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, exceto pele não melanoma (Figura 1). A estimativa do INCA para 2012, válida também para o ano de 2013, é de 52.680 novos casos. Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. A sobrevida média após cinco anos na população de países desenvolvidos tem apresentado um discreto aumento, em torno de 12%, representando 85%. Entretanto, nos países em desenvolvimento, a sobrevida fica em torno de 60%. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta (INCA, 2012).

São vários os fatores que aumentam esse risco. Os mais conhecidos são: idade, histórico familiar, alterações genéticas (principalmente alterações no BRCA1 e BRCA2), fatores hormonais (idade tardia do primeiro filho, nuliparidade, menarca precoce, menopausa tardia, uso de terapia hormonal), alterações histológicas marcadoras de risco (hiperplasia ductal e lobular atípica, carcinoma lobular *in situ*), câncer de mama ou ovário prévio, alcoolismo, obesidade, ingestão rica em gorduras e pobre em fibras, sedentarismo. A amamentação, prática de atividade física e alimentação saudável com a manutenção do peso corporal estão associadas a um menor risco de desenvolver esse tipo de câncer (INCA, 2012).

Localização primária					Localização primária		
	casos novos	percentual				casos novos	percentual
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	Mama Feminina	52.680	27,9%
Próstata	60.180	30,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Estômago	12.670	6,5%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Estômago	7.420	3,9%
Esôfago	7.770	4,0%			Ovário	6.190	3,3%
Bexiga	6.210	3,2%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Laringe	6.110	3,1%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%					

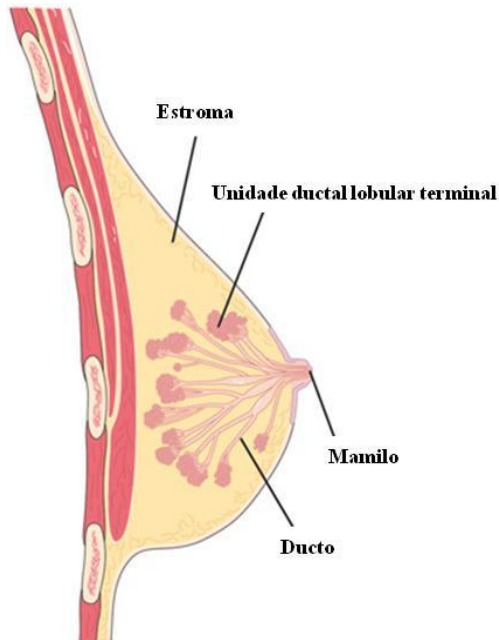
\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

**Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma.** Os tipos mais incidentes no Brasil serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil).

Fonte: Estimativa 2012 - Incidência de câncer no Brasil (INCA).

A mama humana é composta por uma ramificação de redes de ductos que se encerram em pequenas estruturas ductais denominadas unidades ductal lobular terminal (TDLU) (Figura 2). A maior parte dos cânceres de mama se origina na TDLU (VISVADER, 2009). Os ductos contêm células epiteliais luminais e mioepiteliais. As células epiteliais ductais formam os ductos; as células epiteliais alveolares são as células produtoras de leite; e as células mioepiteliais, são células contrateis que revestem os ductos e os alvéolos (KAKARALA e WICHA, 2008). O estroma mamário é formado por tecido adiposo e conjuntivo envolvendo a TDLU, os vasos sanguíneos e os vasos linfáticos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012). A glândula mamária é derivada da

epiderme e seu desenvolvimento depende de interações estroma-epitélio que modulam o desenvolvimento normal da mama e também participa da transformação maligna do tecido regulando o crescimento, sobrevivência, migração e diferenciação do epitélio da mama (KASS *et al.*, 2007).



**Figura 2 - Anatomia da mama humana.** Desenho esquemático da anatomia da mama humana formada por tecido estromal com ramificações de redes de ductos que se encerram pequenos aglomerados de ductos que constituem as unidades ductal lobular terminal (TDLU).

Fonte: VISVADER, 2009.

## 1.2 Marcadores moleculares

O câncer de mama é uma doença genética complexa, caracterizada pelo acúmulo de alterações moleculares múltiplas. Ele constitui um grupo heterogêneo de neoplasias, constituído por vários tipos histológicos, que diferem nas manifestações clínicas, evolução e resposta terapêutica. Pode ser classificado em subtipos distintos com base em seus perfis de expressão gênica: HER-2 positivo, luminal (A e B), basal e “mama normal” (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001).

Atualmente existem três fatores moleculares prognósticos/preditivos validados para uso clínico rotineiro no tratamento das pacientes com câncer de mama. São eles, os receptores hormonais para estrógeno (RE) e progesterona (RP) e o receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER-2). Fatores prognósticos são definidos pelas características clínicas, patológicas e

biológicas que permitem prever a evolução clínica da doença ou sobrevida das pacientes no momento do diagnóstico. Fatores preditivos, em contraste, são características clínicas, patológicas e biológicas que são utilizadas para estimar a probabilidade de resposta a um tipo particular de terapia adjuvante (ALLRED *et al.*, 2010). Por exemplo, pacientes com tumores RE positivos podem ser tratadas com moduladores seletivos dos receptores estrogênicos (SERM) ou com inibidores de aromatase e, pacientes com tumores que superexpressam HER-2 podem ter aumento da sobrevida quando tratados com o anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2 ou Trastuzumab (Herceptin®) (SLAMON *et al.*, 2001). Além destes, outros marcadores têm sido avaliados, como Ki-67, p53, marcadores vasculares, p63, citoqueratina 5 e P-caderina (FITZGIBONS *et al.*, 2000; MATOS *et al.*, 2005; PAREDES *et al.*, 2005; MILLAR *et al.*, 2011; FASCHING *et al.*, 2011).

O receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (*ERBB2*) é um proto-oncogene que codifica uma proteína receptora transmembranosa com atividade tirosina-quinase envolvida no crescimento celular, diferenciação, apoptose e metástase (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001). A superexpressão da proteína HER-2 é encontrada em aproximadamente 18-20% dos cânceres de mama, sendo amplificação do gene o principal mecanismo de superexpressão gênica (SLAMON *et al.*, 1987; BURSTEIN *et al.*, 2005). Essa superexpressão está associada a tumores de alto grau, com comprometimento da cadeia linfática (BURSTEIN *et al.*, 2005), e alta taxa de recidiva e mortalidade (WOLFF *et al.*, 2007)

Os receptores hormonais atuam no crescimento e diferenciação do epitélio mamário normal. O gene receptor de estrógeno (*ESR1*) codifica um fator de transcrição nuclear ativado pelo estrógeno (ALLRED, 2010) e o receptor de progesterona (*PGR*) é um gene regulado pelo estrógeno. Eles são usados como indicador de terapia hormonal, melhorando a sobrevida das pacientes (PAYNE *et al.*, 2008).

A proteína nuclear Ki-67, codificada pelo gene *MKI67* (antígeno identificado por anticorpo monoclonal), está associada à proliferação celular, sendo expressa em todas as fases do ciclo

celular, exceto G0 (GERDES *et al.*, 1984). AZAMBUJA e colaboradores (2007) realizaram uma meta-análise confirmando que a alta expressão *MKI67* confere alto risco de recorrência e baixa sobrevida em paciente com câncer de mama em estágio inicial.

*TP63* (proteína de tumor p63) é um membro da família p53 (gene supressor de tumor) com seis isoformas com propriedades distintas. É altamente expresso na camada basal dos tecidos epiteliais, atuando no desenvolvimento desses tecidos através na manutenção das populações de células progenitoras (YANG *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 1999). Atua também no reparo do DNA induzindo parada do ciclo celular e apoptose (GRESSNER *et al.*, 2005). A proteína p63 foi detectada em vários tipos de cânceres (pulmão, próstata, mama, entre outros) (MASSION *et al.*, 2003; DHILLON *et al.*, 2009; HANKER *et al.*, 2010).

As citoqueratinas são proteínas dos filamentos intermediários do citoesqueleto expressas em todos os tecidos epiteliais. São importantes na estabilidade mecânica e na integridade das células. São utilizadas como marcadores para identificar a origem do tumor primário, uma vez que as neoplasias epiteliais mantêm o padrão de citoqueratina associado às células de origem (MOLL *et al.*, 2008). A citoqueratina 5, codificada pelo gene *KRT5* (queratina 5), é encontrada nas células basais e mioepiteliais de tecidos glandulares, como a mama, sendo que alterações na sua expressão estão associadas a um prognóstico desfavorável (KARANTZA, 2011).

Caderinas (E-caderina, P-caderina, N-caderina, e R-caderina) são glicoproteínas transmembrana cálcio-dependente localizadas nas junções aderentes que medeiam adesão célula-célula (LABELLE *et al.*, 2008). A P-caderina, codificada pelo gene *CDH3*, se liga mais fracamente ao filamento de actina do citoesqueleto quando comparada a E-caderina proporcionando uma adesão menos estável entre as células, favorecendo proliferação celular (WU *et al.*, 1993). Segundo PAREDES e colaboradores (2005), a P-caderina é capaz de aumentar a capacidade de invasão das células tumorais e conseqüentemente a agressividade dos tumores mamários. Eles também acreditam que a expressão aberrante dessa proteína ocorre devido à hipometilação do promotor.



RAPPA e LORICO (2010) acreditam que a diversidade de tipos tumorais, manifestações clínicas e perfil molecular encontrada nos carcinomas mamários podem ser atribuídos, pelo menos em parte, a existência de células nesses tumores, denominadas células-tronco do câncer (CSC's).

### **1.3 Células-tronco do câncer**

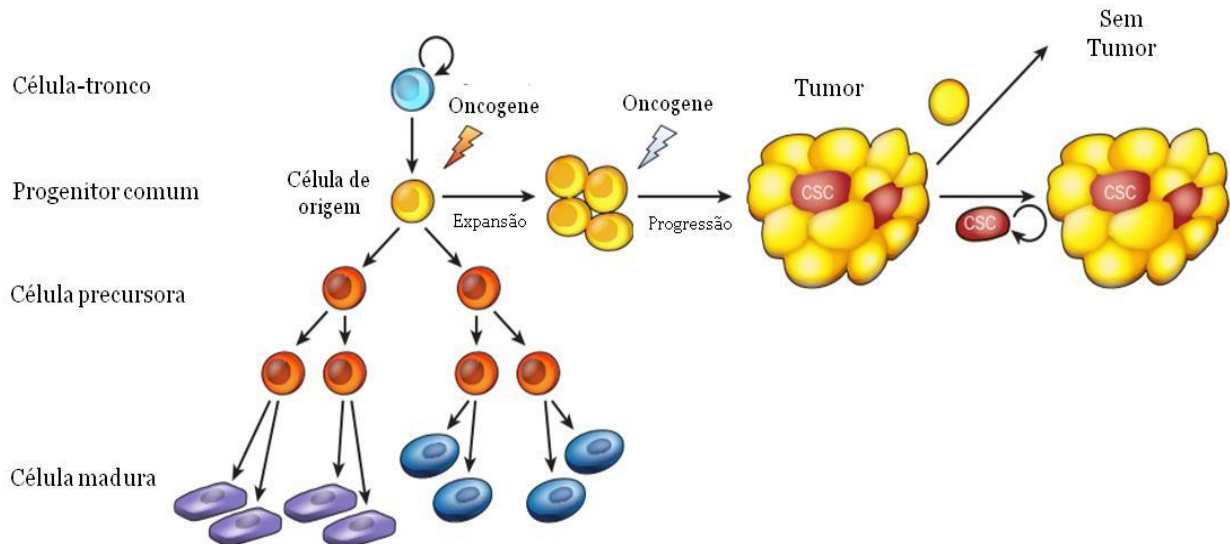
As células-tronco são definidas como células que possuem a capacidade de se perpetuar através da autorrenovação e de se diferenciar em células maduras de um tecido particular (REYA *et al.*, 2001). Elas podem ser classificadas em células-tronco embrionárias, que apenas existem nos primeiros estágios do desenvolvimento e são capazes de originar todos os tipos celulares, e em células-tronco adultas, consideradas células multipotentes, capazes de se diferenciar em múltiplas linhagens com expressão de marcadores de superfície específicos do tecido de origem. As células-tronco adultas podem ser divididas em células-tronco hematopoiéticas, que dão origem as células sanguíneas e em células-tronco não hematopoiéticas (células-tronco mesenquimais) encontradas em todo o corpo, incluindo medula óssea, cérebro, sangue periférico, vasos sanguíneos, músculo esquelético, pele, polpa dental dos dentes, coração, intestino, fígado, epitélio do ovário e do testículo (ISSCR, 2011).

O processo de diferenciação ocorre de forma hierárquica a partir das células-tronco até as células progenitoras comprometidas, que por sua vez dão origem as células diferenciadas (VISVADER, 2011). Na mama, as células-tronco originam as três linhagens mamárias, as células epiteliais ductais (formam os ductos); as células epiteliais alveolares (produtoras de leite); e as células mioepiteliais (células contrateis que revestem os ductos e os alvéolos) (KALARARA e WICHA 2008). REYA e colaboradores (2001) acreditam que a biologia de células-tronco pode melhorar os conhecimentos sobre a biologia do câncer devido a semelhanças entre os dois tipos celulares, como os mecanismos de autorrenovação, embora desregulados nas células cancerosas.

Tumores sólidos como os de mama, pulmão, colón, próstata e ovário são formados por uma variedade de células com uma heterogeneidade funcional com distinta capacidade de proliferação e diferenciação (HEPPNER e MILLER, 1983). Existem dois modelos para explicar essa

heterogeneidade, um deles é o modelo de evolução clonal onde qualquer célula com capacidade proliferativa que sofra mutações pode formar novos tumores e, o modelo conhecido como células-tronco do câncer (CSC) onde apenas uma pequena população de células é capaz de proliferar e formar novos tumores. Este último modelo baseia-se na capacidade de autorrenovação dos tumores devido à presença de células-tronco nestes tecidos (REYA *et al.*, 2001; CAMPBELL e POLYAK 2007; VISVADER e LINDEMAN, 2008). A teoria das CSC's propõe uma organização hierárquica de células dentro do tumor, em que uma subpopulação de células tumorais (CSC's) é responsável por sustentar o crescimento do tumor (Figura 3) (VISVADER e LINDEMAN, 2008). As CSC's possuem a capacidade de se dividir dando origem a novas CSC's e de se diferenciar em células não tumorigênicas, que parecem constituir a maior parte da massa tumoral (CLARKE *et al.*, 2006).

As células-tronco são as candidatas favoritas a serem alvo de mutações, por causa de sua capacidade de autorrenovação e longevidade, o que permite o acúmulo sequencial de mutações genéticas e epigenéticas necessárias para a oncogênese. No entanto, qualquer célula com capacidade proliferativa pode servir como uma CSC's, se adquirir mutações que reestimulem a capacidade de autorrenovação e evitem a diferenciação para um estado pós-mitótico (VISVADER, 2011). As CSC's dividem propriedades e habilidades com as células-tronco normais, o que inclui a capacidade de autorrenovação e de diferenciação, embora sejam aberrantes (VISVADER e LINDEMAN, 2008).



**Figura 3 - Modelo de heterogeneidade das CSC's.** A hierarquia celular normal compreende as células-tronco que progressivamente geram células progenitoras comuns e células progenitoras mais restritas (célula precursora), originando todos os tipos de células maduras que constituem um tecido particular. O acúmulo de mutações genéticas e epigenéticas dentro de uma população celular podem resultar no surgimento de um CSC (células-tronco do câncer). Neste modelo, apenas o CSC's, e não outra célula tumoral, são capazes de sustentar a tumorigênese.

Fonte: VISVADER, 2011.

Em 2003, AL-HAJJ e colaboradores identificaram uma pequena população de células tumorais ( $CD44^+/CD24^{-/low}$ ) no câncer de mama como sendo as únicas responsáveis por formar novos tumores. Quando eles injetaram uma pequena quantidade dessas células  $CD44^+/CD24^{-/low}$  (cerca de 200 células, o que compreende 1-10% de toda a massa tumoral), isoladas de tumores de mama humana, em camundongos imunocomprometidos foi observado formação de novos tumores com a mesma heterogeneidade fenotípica do tumor original. Já quando eles usaram células que não apresentam esse perfil (20.000 células) não houve desenvolvimento tumoral. Isso demonstra que células  $CD44^+/CD24^{-/low}$  são tumorigênicas e com capacidade de autorrenovação e diferenciação. Nos anos seguintes essas células também foram identificadas em outros tipos de câncer (cérebro, colón, pâncreas, cabeça e pescoço) (LI *et al.*, 2007; O'BRIEN *et al.*, 2007; PRINCE *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2004). A população de CSC's também foi identificada como  $ALDH^+$  por GINESTIER e colaboradores (2007), além disso, eles correlacionaram a expressão dessa molécula com prognóstico desfavorável. O ALDH (Aldeído desidrogenase) é uma enzima responsável pela oxidação de aldeídos intracelulares e acredita-se que tem um importante papel

na diferenciação das células-tronco através do metabolismo do ácido retinóico (SOPHOS e VASILIOU, 2003; CHUTE *et al.*, 2006).

As células-tronco normais e as CSC's possuem várias propriedades em comum, como, quiescência, capacidade de autorrenovação, atividade da telomerase ativa, resistência a apoptose (alta expressão de moléculas antiapoptóticas), atividade aumentada de transportadores de membrana (Transportadores ABC), independência de ancoragem e habilidade de migrar. Essas características a tornam inerentemente mais resistentes a terapias atuais contra o câncer (DONTU e AL-HAJJ *et al.*, 2003; DEAN *et al.*, 2005). Muitos pacientes com câncer, particularmente com tumores sólidos, não respondem a terapias existentes (quimioterapia, radioterapia, e agentes tumor-alvo) ou apresentam recidivas (DEAN *et al.*, 2005; PHILLIPS *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011). Segundo ZHOU e colaboradores (2009), uma explicação para isso pode ser a resistência inerente das CSC's às drogas, ineficiência do tratamento e/ou instabilidade genética das células tumorais. Tem sido sugerido que tumores mais agressivos contêm uma grande quantidade de CSC's (ZHOU *et al.*, 2009).

Segundo PHILLIPS e colaboradores (2006), as CSC's mamárias são relativamente radorresistentes e a sua população aumenta em número após pequenas doses de radiação fracionada. Essas evidências sugerem um possível mecanismo para a repopulação acelerada das células tumorais observada durante intervalos no tratamento radioterápico. Outros trabalhos também mostraram a resistência das CSC's a terapias quimioterápicas, como no câncer de mama, pulmão, cólon-retal (DYLLA *et al.*, 2008; LEVINA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008). Essa resistência pode explicar a recorrência da doença após tratamento radioterápico ou quimioterápico de tumores sólidos, aparentemente bem sucedidos. As CSC's podem acentuar certas formas de dormência tumoral, onde as células cancerosas latentes persistem por anos ou décadas após remoção cirúrgica ou radio/quimioterapia e surgem de repente. Assim, as CSC's representam uma ameaça dupla: são mais resistentes ao tratamento e são capazes de regenerar o tumor após o final da terapia (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Existem evidências de que as CSC's (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup>/ALDH<sup>+</sup>) desempenham um papel importante no processo de metástase. ABRAHAM e colaboradores (2005) realizaram um estudo com 136 amostras de tumores primários de câncer de mama. Através de análise de imunohistoquímica eles identificaram as células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> e observaram um alto percentual dessas células em amostras de pacientes que apresentaram metástase. O CD44 é uma molécula de adesão celular ligando as células ao ácido hialurônico e sua expressão está associada a aumento da motilidade celular (ZOHAR *et al.*, 2000; ABRAHAM *et al.*, 2005). CD24 é um regulador negativo do receptor de quimiocina CXCR4 (molécula envolvida na metástase do câncer de mama) (ABRAHAM *et al.*, 2005). SCHINDELMANN e colaboradores (2002) observaram que linhagens celulares de câncer de mama invasivo apresentaram baixa expressão dessa molécula quando comparada com linhagens celulares não invasivas. Outros estudos também demonstraram que células ALDH<sup>+</sup> têm capacidade aumentada de invasão e são capazes de metabolizar drogas quimioterápicas, como ciclofosfamida (CHARAFE-JAUFFRET *et al.*, 2009; SLÁDEK *et al.*, 2002 ).

Segundo DONTU e colaboradores (2003) e DONTU e AL-HAJJ e colaboradores (2003), células mamárias podem ser propagadas *in vitro* em um estado indiferenciado em meio de cultivo específico em uma superfície de baixa aderência. Sob essas condições a maioria das células morre por *anoikis* (apoptose desencadeada devido à interação inapropriada célula/matriz extracelular) devido à ausência de um substrato de ancoragem, mas uma pequena população de células é capaz de sobreviver e proliferar formando esferas não aderentes multicelulares, denominadas mamoesferas. As mamoesferas possuem células com características funcionais de células-tronco/progenitoras e, são capazes de se diferenciar nas três linhagens da mama (luminal, mioepitelial e alveolar) (DONTU *et al.*, 2003 e DONTU e AL-HAJJ *et al.*, 2003). Esse tipo de cultivo foi primeiro descrito por REYNOLDS e WEISS (1992) utilizando células neuronais, gerando um grande avanço na pesquisa com células-tronco. GINESTIER e colaboradores (2007) mostraram que as mamoesferas são capazes de formar estruturas mamárias quando transplantadas em camundongos imunocomprometidos.

#### 1.4 Cultura tridimensional

A glândula mamária, assim como muitos órgãos glandulares, é embebida em um estroma composto por células mesenquimais, como fibroblastos, adipócitos, células do sistema imune, e matriz extracelular (WEIGELT e BISSELL, 2008). A matriz extracelular, uma complexa rede tridimensional de macromoléculas (colágeno, fibronectina, laminina e glicosaminoglicanos) produzida pelos fibroblastos estromais e células epiteliais, fornece suporte estrutural, sinais de sinalização via receptores transmembrana dirigindo a organização do citoesqueleto e da cromatina para manter a integridade tecidual. A interação célula-célula e célula-matriz extracelular, juntamente com moléculas sinalizadoras são importantes na regulação da homeostasia e do fenótipo tecidual (BISSELL *et al.*, 1982; BISSELL e RADISKY, 2001; BISSELL *et al.*, 2002).

Importantes sinais são perdidos quando as células são cultivadas *ex vivo* em substratos plásticos. Assim, estudos *in vitro* em monocamada (2D), resultam em perda de organização morfológica e função tecido-específica, devido a perda dos sinais vindos da matriz extracelular. Portanto, eles não são um modelo ideal para estudos sobre os mecanismos regulatórios da proliferação, morte celular e diferenciação que influenciam na formação e função da glândula mamária, tanto no processo fisiológico quanto tumorigênico (WEIGELT e BISSELL, 2008).

Isso torna os estudos em modelos tridimensionais (3D) muito importantes, pois mimetizam mais fielmente a arquitetura tumoral, a regulação da transdução de sinal e comportamento tumoral *in vivo*, reconstruindo assim o fenótipo do tecido *in vitro*. Estes modelos são de grande utilidade nos estudos moleculares e de vias de sinalização *ex vivo* na busca por novos alvos moleculares e no rastreamento de novas drogas terapêuticas (WEIGELT e BISSELL, 2008).

Trabalhos mostram que as células não malignas quando cultivadas em 3D formam colônias de células polarizadas com divisão celular limitada, semelhantes às acinos, já as células malignas apresentam diferentes morfologias de colônias com perda da polaridade tecidual, desorganização arquitetural e crescimento contínuo (PETERSEN *et al.*, 1992; PARK *et al.*, 2006). Também foi demonstrado diferenças na sensibilidade das células não malignas e malignas a drogas

quimioterápicas quando cultivadas em 2D e 3D. Quando essas células (malignas e não malignas) foram cultivadas em sistema 2D elas apresentaram sensibilidade a apoptose. Em cultivo 3D, apenas as células não malignas se mostraram resistentes. Quando os autores reverteram o fenótipo desorganizado das células malignas a estruturas polarizadas elas se mostraram resistentes (WEAVER *et al.*, 2002). É sabido que a forma da célula e o seu microambiente podem determinar seu comportamento e a expressão gênica (KIM, 2005). De fato, KENNY e colaboradores (2007) conseguiram correlacionar a expressão gênica apresentada com a morfologia observada em linhagens mamárias não malignas e malignas cultivadas em 3D. WEIGELT e colaboradores (2010) demonstraram a influência do microambiente na regulação da via de sinalização a jusante (*downstream*) do HER-2 e seu efeito na resposta a drogas anti-HER2 em linhagens celulares de câncer de mama HER-2 positivas cultivadas em 2D e 3D.

A maior parte dos trabalhos sobre CSC's utilizam ensaios *in vivo* através de xenotransplantes. O desenvolvimento de ensaios que permitem a formação de mamoesferas, ou seja, células-tronco/progenitoras *in vitro* através de tecidos ou linhagens celulares é confiável e de baixo custo (SHAW *et al.*, 2012). Existe uma grande vantagem em se trabalhar com linhagens celulares já estabelecidas ao invés de utilizar tumores humanos, devido à dificuldade de se conseguir o material além de problemas éticos. As linhagens celulares são uma fonte ilimitada, que nos permite estudar apenas as células carcinomatosas sem a presença de células normais e estroma (CHARAFE-JAUFFRET *et al.*, 2009). Tem sido o modelo de estudo mais utilizado para estudar proliferação, apoptose, migração e como esses mecanismos se tornam desregulados no câncer (LACROIX e LECLERCQ, 2004). Culturas 2D são de fácil manuseio e reprodutibilidade, no entanto esse tipo de cultura não provém o microambiente 3D do tecido (KIM, 2005).

Diante do exposto nota-se a grande importância de se trabalhar com linhagens celulares em modelos tridimensionais. Assim, neste trabalho pretende-se caracterizar as células-tronco/progenitoras isoladas a partir de linhagens celulares humanas de carcinoma de mama em cultivo 2D e 3D. O conhecimento da participação das CSC's no processo de carcinogênese no

câncer de mama poderá abrir novas perspectivas no diagnóstico e/ou no tratamento desta doença, pois ainda hoje pouco se sabe da real contribuição destas células neste processo.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar linhagens celulares humanas de carcinoma de mama e isolar células-tronco/progenitoras a partir do cultivo *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Cultivar linhagens celulares humanas de carcinoma de mama em monocamada e sistema tridimensional;
- Promover o isolamento de células-tronco/progenitoras das linhagens celulares humanas de carcinoma de mama por pressão seletiva exercida por meio de cultura adequado;
- Caracterizar morfológicamente as linhagens celulares e as células-tronco/progenitoras por microscopia óptica através da marcação com Faloidina/DAPI, Image it™,  $\alpha$ -tubulina, E-caderina, VE-caderina;
- Realizar imunofenotipagem das linhagens celulares utilizando os marcadores anti-CD90, anti-CD105, anti-CD146, anti-CD24, anti-CD31, anti-CD34 e anti-CD45;
- Obter o perfil de expressão dos genes receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (*ERBB2*), citoqueratina 5 (*KRT5*), antígeno identificado por anticorpo monoclonal (*MKI67*), P-caderina (*CDH3*) e proteína de tumor p63 (*TP63*) das linhagens celulares e das células-tronco/progenitoras;
- Obter o perfil de expressão proteica das linhagens celulares e das células-tronco/progenitoras por SDS-PAGE.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo Celular

##### 3.1.1 Linhagens celulares humanas

As linhagens celulares, carcinoma ductal invasor de mama BT-549 (Cat. # HTB-122™) e carcinosarcoma de mama Hs 578T (Cat. # HTB-126™), adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC), foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma, cat. # R6504) com 10% de soro fetal bovino (Sigma, cat. # F6178) e 0,10µg/mL de insulina bovina (Sigma, cat. # I1882) e, DMEM (Sigma, cat. # D7777) com 10% de soro fetal bovino (Sigma, cat. # F6178) e 0,01mg/mL de insulina bovina (Sigma, cat. # I1882), respectivamente, a 37°/5%CO<sub>2</sub>.

##### 3.1.2 Células-tronco/progenitoras

O cultivo de células-tronco/progenitoras (mamo esféricas) das linhagens celulares foi feito em placas de 24 poços para células em suspensão (Corning, cat. # 83.1836.500). As linhagens celulares foram tripsinizadas e a suspensão celular ( $1 \times 10^4$  células/poço) foi semeada utilizando 1,0mL de meio DMEM/F-12 (Sigma, cat. # D0547) por poço suplementado com 20ng/mL de EGF (Sigma, cat. # E1257), 10µg/mL de insulina bovina (Sigma, cat. # I1882), 2% de soro de cavalo (Sigma, cat. # H1270) e 0,5µg/mL de hidrocortisona (Sigma, cat. # H0135) por sete dias. O meio de cultura foi trocado 2x durante o cultivo da seguinte maneira: retirou-se 0,5mL de meio e adicionou-se 0,5mL de meio novo.

##### 3.1.3 Cultura tridimensional

O ensaio em Matrigel™ (*On-top assay*) foi realizado conforme descrito por LEE e colaboradores (2007). As culturas foram mantidas por três dias a 37°/5%CO<sub>2</sub>. As linhagens celulares foram tripsinizadas e a suspensão celular ( $4 \times 10^4$  células/poço) foi semeada em placa de 24 poços em uma matriz tridimensional Matrigel™ (BD, Cat. # 354234) utilizando o seu respectivo meio de cultura (RPMI 1640 e DMEM), porém sem suplementação.

As mamo esféricas, após os sete dias de cultivo, foram semeadas no Matrigel™ utilizando o meio DMEM/F-12 conforme descrito no item 3.1.2 da seguinte maneira: foram ressuspensos 12 poços

de cultivo das mamoesferas em 1,0mL de meio DMEM/F-12 e semeados 0,1mL em cada poço contendo Matrigel™.

### 3.2 Caracterização celular por microscopia óptica

#### 3.2.1 Imunofluorescência

Células cultivadas ( $1,0 \times 10^5$  células/poço) por 24h em placa de 24 poços foram fixadas com formaldeído 4% por 1h, em temperatura ambiente (TA), lavadas 3 vezes com PBS 1X e, em seguida incubadas com tampão de bloqueio (10% de soro fetal bovino (SFB), 1% albumina bovina (BSA) em PBS 1X) por 1h (TA). Após lavar as células 3 vezes com PBS 1X, elas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio na concentração indicada pelo fabricante por 45 min (TA). Os anticorpos primários utilizados foram anti-E-caderina (BD, Cat. # 810182), anti-VE-caderina conjugado Alexa Fluor® 488 (eBioscience, Cat. # 53.1449-71), anti- $\alpha$ -tubulina (Zymed, Cat. # 13-8000). Em seguida as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse IgG (Fab específico) - FITC (Sigma, Cat. # F5262) diluído 1:40 em 1% BSA/PBS 1X por 30 min. (TA), exceto para o anti-VE-caderina. As células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e o núcleo celular foi contra-corado com *4,6-diaminidino-2-phenylindole* - DAPI (Molecular Probes, Cat. # D13061) na concentração de 300nM por 5min. (TA). No caso, do anti- $\alpha$ -tubulina as células foram permeabilizadas com PBT (0,1 % de Triton X-100 em PBS 1X) por 10 min antes da incubação com o tampão de bloqueio e as soluções utilizadas foram preparadas em PBT ao invés de PBS 1X. As células marcadas foram visualizadas no microscópio invertido de fluorescência AxioVert 200 (Zeiss). As culturas tridimensionais foram marcadas no 3° dia de cultivo diretamente no Matrigel™ dobrando o tempo de incubação.

#### 3.2.2 Fluorescência

Foi utilizado o kit *Image-iT™ LIVE Plasma Membrane and Nuclear Labeling* (Invitrogen, Cat. # I34406) para marcação na membrana plasmática/núcleo e os marcadores Faloidina Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Cat. # A12379) para marcação dos filamentos de actina do citoesqueleto e o núcleo foi contracorado com DAPI (Molecular Probes, Cat. # D13061), segundo recomendações

dos fabricantes. As células marcadas foram visualizadas no microscópio invertido de fluorescência AxioVert 200 (Zeiss). As culturas tridimensionais foram marcadas no 3º dia de cultivo diretamente no Matrigel™ dobrando o tempo de incubação.

### 3.3 Caracterização celular por citometria de fluxo

As células foram lavadas com PBS 1X e ressuspensas em tampão de lavagem (PBS 1X + 0,1% de azida sódica + 1% SFB) ( $1,0 \times 10^6$  células/100µl). Em seguida foram adicionados os anticorpos anti-humano conjugados com fluorocromo e seus respectivos controles de isotipo (Tabela 1) na concentração recomendada pelo fabricante. Os anticorpos foram incubados protegidos da luz por 30 min. a temperatura ambiente. As células marcadas foram lavadas com tampão de lavagem e ressuspensas em 0,5 mL do mesmo tampão e, em seguida analisadas no equipamento FACSCanto II (BD Bioscience) utilizando o *software* FACSDiva 6.1.3.

Tabela 1 - Marcadores para citometria de fluxo.

Anticorpos	Clone	Isotipo	Marca	Catálogo
V450 mouse anti-humano CD31	WM59	Ms IgG1 κ	BD Bioscience	561653
APC mouse anti-humano CD34	581	Ms IgG1 κ	BD Bioscience	555824
AmCyan mouse anti-humano CD45	2D1	Ms IgG1 κ	BD Bioscience	339192
PE-Cy™7 mouse anti-humano CD90	5E10	Ms IgG1 κ	BD Bioscience	561558
PerCP-Cy™5.5 mouse anti-humano CD105	266	Ms IgG1 κ	BD Bioscience	560819
PE mouse anti-humano CD146	P1H12	Ms IgG1 κ	BD Bioscience	550315
FITC mouse anti-humano CD24	SN3	Ms IgG1	Invitrogen	MHCD240
V450 Mouse IgG1 κ Controle isotipo	MOPC-21	-	BD Bioscience	560373
APC Mouse IgG1 κ Controle isotipo	MOPC-21	-	BD Bioscience	555751
AmCyan Mouse IgG1 κ Controle isotipo	X-40	-	BD Bioscience	339185
PE-Cy™7 Mouse IgG1 κ Controle isotipo	MOPC-21	-	BD Bioscience	557872
PerCP-Cy™5.5 Mouse IgG1 κ Controle isotipo	MOPC-21	-	BD Bioscience	550795
PE Mouse IgG1 κ Controle isotipo	MOPC-21	-	BD Bioscience	555749
FITC Mouse IgG1 Controle isotipo	-	-	Invitrogen	MG101

### 3.4 Análise do perfil de expressão gênica

#### 3.4.1 Extração de RNA total

##### 3.4.1.1 Cultivo 2D

Para extração do RNA total  $1,0 \times 10^6$  células foram homogeneizadas em 1,0mL de TRIzol® (Invitrogen, Cat. # 15596-018), segundo instruções do fabricante.

##### 3.4.1.2 Cultivo 3D

No 3º dia de cultivo foi feita a extração de RNA das células cultivadas no Matrigel™. O Matrigel™ foi previamente digerido com 0,46 mL dispase 10mg/mL (Gibco, Cat. # 17105-041) por 1h a 37°C para a retirada das células. Após o tempo de incubação foi adicionado 1,0 mL de EDTA 5mM (Sigma, Cat. # E6758) para interromper a digestão enzimática. Em seguida as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X. Foi adicionado TRIzol® (0,7 mL/poço) ao precipitado obtido, segundo instruções do fabricante.

A concentração de RNA total e a absorbância 260/280 foram mensuradas usando o espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare) A qualidade do RNA total foi avaliada pela integridade dos RNAs ribossomais 28S e 18S, após o fracionamento eletroforético em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídio (0,15 µg/mL). O RNA total foi em seguida tratado RNase-free DNase Set (Qiagen, cat. # 79254).

#### 3.4.2 Síntese de cDNA

O cDNA foi gerado a partir de 1,0 µg de RNA utilizando a enzima *M-MLV Reverse transcriptase* (Promega, Cat. # M170A), de acordo com as recomendações do fabricante.

#### 3.4.3 Análise do perfil de expressão gênica

A técnica de PCR quantitativo em tempo real - qRT-PCR foi realizada no equipamento Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) utilizando a tecnologia do Brilliant II SYBR Green QPCR master mix (Agilent Technologies, Cat. # 600828), segundo recomendações do fabricante. Os genes estudados foram o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (*ERBB2*), Citoqueratina 5 (*KRT5*), antígeno identificado por anticorpo monoclonal (*MKI-67*), P-caderina (*CDH3*) e proteína de tumor p63 (*TP63*). Os iniciadores para os genes alvo foram selecionados com base no banco

*PrimerBank* (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). A autenticidade dos iniciadores para o gene alvo foi certificada com uso da ferramenta *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Também foi certificado que todos os iniciadores estudados apresentavam temperatura de anelamento semelhantes (ao redor de 60°C), produtos de amplificação de tamanho entre 100-300pb, concentração de G/C entre 20-70%. Os valores de Ct obtidos foram normalizados usando o gene de referência TBP (*TATA box binding protein*) e o nível de expressão relativa foi calculado usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) tendo como calibrador as linhagens celulares parentais ou as mamoesferas-derivadas. As sequências dos iniciadores usados estão descritas na tabela 2. A simbologia adotada segue a preconizada por *HGNC - HUGO (Human Genome Organisation) Gene Nomenclature Committee* (<http://www.genenames.org/>).

Também foi realizado um ensaio para avaliar a estabilidade de expressão de genes de referência usando *The RealTime ready Human Reference Gene Panel* assay (Roche, cat. # 05339545001) de acordo com as instruções do fabricante. Para análise dos dados foi utilizado o programa *GeNorm* (Biogazalle).

### **3.5 Análise do perfil de expressão proteica**

As proteínas foram isoladas da fase orgânica da mistura TRIzol®-clorofórmio (obtida no item 3.4.4) através da adição de 0,7mL da solução 4 mol/L isotiocianato de guanidina (Sigma, Cat. G9277), 50 mmol/L citrato de sódio (Sigma, Cat. # S1804) e 1 mol/L Tris (Sigma, Cat. # 154563) pH 8.0. Após mistura vigorosa por inversão a separação de fases (DNA/proteína) foi obtida por centrifugação a 12.000xg por 15 min a 4 °C. As proteínas foram então precipitadas a partir da solução aquosa fase inferior utilizando 1,5 mL de isopropanol de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações foram avaliadas pelo método BCA utilizando o kit *QuantiPro™ BCA* (Sigma, cat. # QPBCA-1KT). O gel de SDS-PAGE foi feito de acordo com LAEMMLI (1970) e 10µL de cada amostra foi aplicada ao gel. Após 1h30min de corrida o gel foi corado por Azul de Coomassie.

### **3.6 Análise estatística**

Foi utilizado o programa REST 2009 (Qiagen) para avaliar a diferença entre os grupos. Valor de p menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores utilizados nas qRT-PCR.

Gene	Função	GeneBank Accession No	Localização	Sequência (5' -> 3')	Tamanho do produto	Referência
<i>ERBB2</i>	Crescimento, diferenciação	NM_004448	17q21.1	FW: CTCTTAGACCATGTCCGGGAA RV: AGCCCGAAGTCTGTAATTTTGAC	182pb	PrimerBank ID 4758298a3
<i>KRT5</i>	Estrutural	NM_000424	12q13.13	FW: AGGAGTTGGACCAGTCAACAT RV: TGGAGTAGTAGCTTCCACTGC	152pb	PrimerBank ID 119395753b3
<i>MKI67</i>	Proliferação celular	X65551	10q26.2	FW: ACGAGACGCCTGGTACTATC RV: CATCTCCATGTTTTAGCCGTACA	250pb	PrimerBank ID 415821a3
<i>TP63</i>	Desenvolvimento celular e gene supressor de tumor	AJ315499	3q28	FW: GGACCAGCAGATTCAGAACGG RV: AGGACACGTCGAAACTGTGC	182pb	PrimerBank ID 169234656c1
<i>CDH3</i>	Adesão celular	NM_001793	16q22.1	FW: GCTGGGGAAAGTATTCATGGG RV: TCAGGGACAGATATTGGAGCAA	204pb	PrimerBank ID 14589891a1
<i>TBP</i>	Transcrição gênica (gene de referência)	NM_003194	6q27	FW: TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA RV: CACATCACAGCTCCCCACCA	132pb	LI <i>et al.</i> , 2009



## 4. OTIMIZAÇÃO DOS ENSAIOS *IN VITRO* DAS CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS E DOS ENSAIOS DE qRT-PCR PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

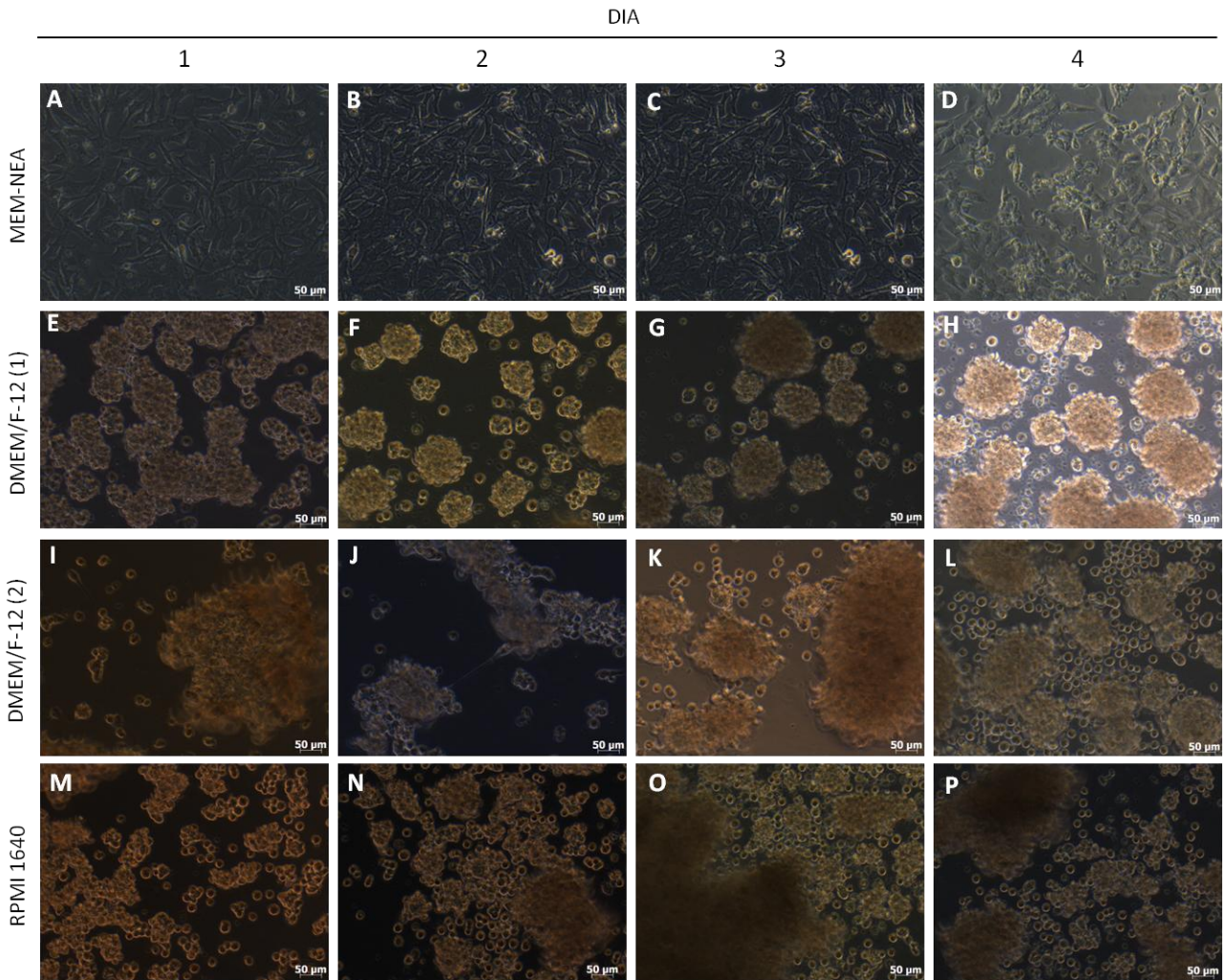
### 4.1 Otimização do cultivo das células-tronco/progenitoras

Para o isolamento e caracterização das células-tronco/progenitoras (mamoesferas) foi realizada uma otimização do cultivo. Para isso, diferentes meios de cultura foram testados utilizando a linhagem celular BT-549 de acordo com a Tabela 3. O cultivo nos meios RPMI 1640, DMEM/F-12 (1) e DMEM/F-12 (2) favorecem a formação de mamoesferas-derivadas. A princípio o DMEM/F-12 (1) apresentou o melhor resultado entre os três meios, mas a partir do terceiro dia o DMEM/F-12 (2) mostrou-se melhor por apresentar uma maior quantidade de mamoesferas-derivadas em cultura (Figura 4). Infelizmente a Figura 4 não retrata bem esse fato devido ao campo selecionado para o registro fotográfico. O cultivo em meio MEM-NEA apresentou células com morfologia semelhante de células cultivadas em seu meio de crescimento original (de acordo com ATCC), provavelmente devido à presença de soro fetal bovino (DONTU *et al.*, 2003) que favorece a diferenciação e adesão celular. DONTU e colaboradores (2003) mostraram que meio sem soro fetal bovino e com fatores de crescimento, insulina bovina e hidrocortisona promove condições favoráveis para a formação de mamoesferas-derivadas. Eles também determinaram que a eficiência de formação das mamoesferas-derivadas é maior na presença de fatores de crescimento. Nós mostramos que a presença de soro de cavalo como fonte de proteína ao invés da albumina bovina se mostrou eficiente na formação da mamoesferas-derivadas.

Tabela 3 - Suplementação de meios de cultivo para ensaios de obtenção de mamoesferas.

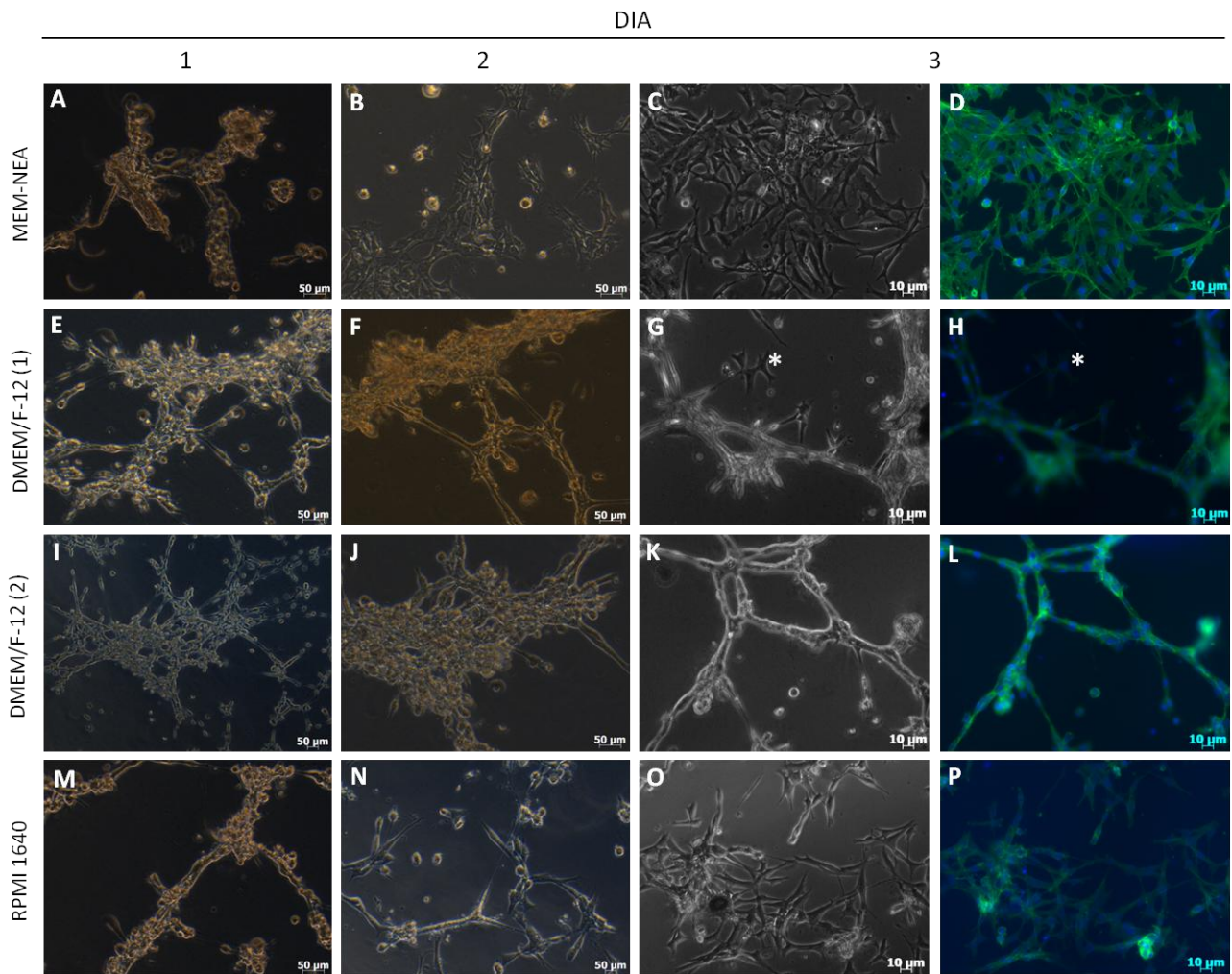
Suplementos	DMEM/F-12 (1)* (Sigma, cat. #D0547)	MEM-NEA** (Sigma, cat. #M0643)	DMEM/F-12 (2)*** (Sigma, cat. #D0547)	RPMI 1640 (Sigma, cat. #R6504)
Fator de crescimento epidérmico (EGF) (Sigma, cat. # E1257)	20ng/mL	-	20ng/mL	20ng/mL
Fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (Sigma, cat. # 3133)	10ng/mL	-	-	10ng/mL
Insulina bovina (Sigma, cat. # 11882)	5µg/mL	-	10µg/mL	5µg/mL
Albumina bovina (BSA) (USBiological, cat. # A1320)	0,4%	-	-	0,4%
Soro fetal bovino (SFB) (Sigma, cat. # F6178)	-	20%	-	-
L-glutamina (Sigma, cat. # G5763)	-	1%	-	-
Ácido ascórbico (Sigma, cat. # A4034)	-	45mg/mL	-	-
Piruvato de sódio (Sigma, cat. #P22560)	-	1%	-	-
d-Biotina (Sigma, cat. # B4639)	-	0,1mg/mL	-	-
Vitamina B12 (Sigma, cat. # V6629)	-	1,36mg/mL	-	-
Soro de cavalo (Sigma, cat. #H1270)	-	-	2%	-
Hidrocortisona (Sigma, cat. #H0135)	-	-	0,5µg/mL	-

\* PONTI *et al.* (2005); \*\*BUNNELL *et al.* (2008); \*\*\*DEBNATH *et al.* (2003)



**Figura 4 - Otimização do cultivo das mamoesferas-derivadas obtidas a partir da linhagem celular BT-549 em cultura 2D por quatro dias.** (A a D): Cultivo em meio MEM-NEA mostrando a linhagem BT-549 aderida formando monocamada. No quarto dia as células estão morrendo devido a falta de nutrientes e espaço. (E a H), (I a L) e (M a P) Cultivo em meio DMEM/F-12 (1), DMEM/F-12 (2) e RPMI 1640, respectivamente, mostrando a formação das mamoesferas-derivadas nos quatro dias de cultivo.

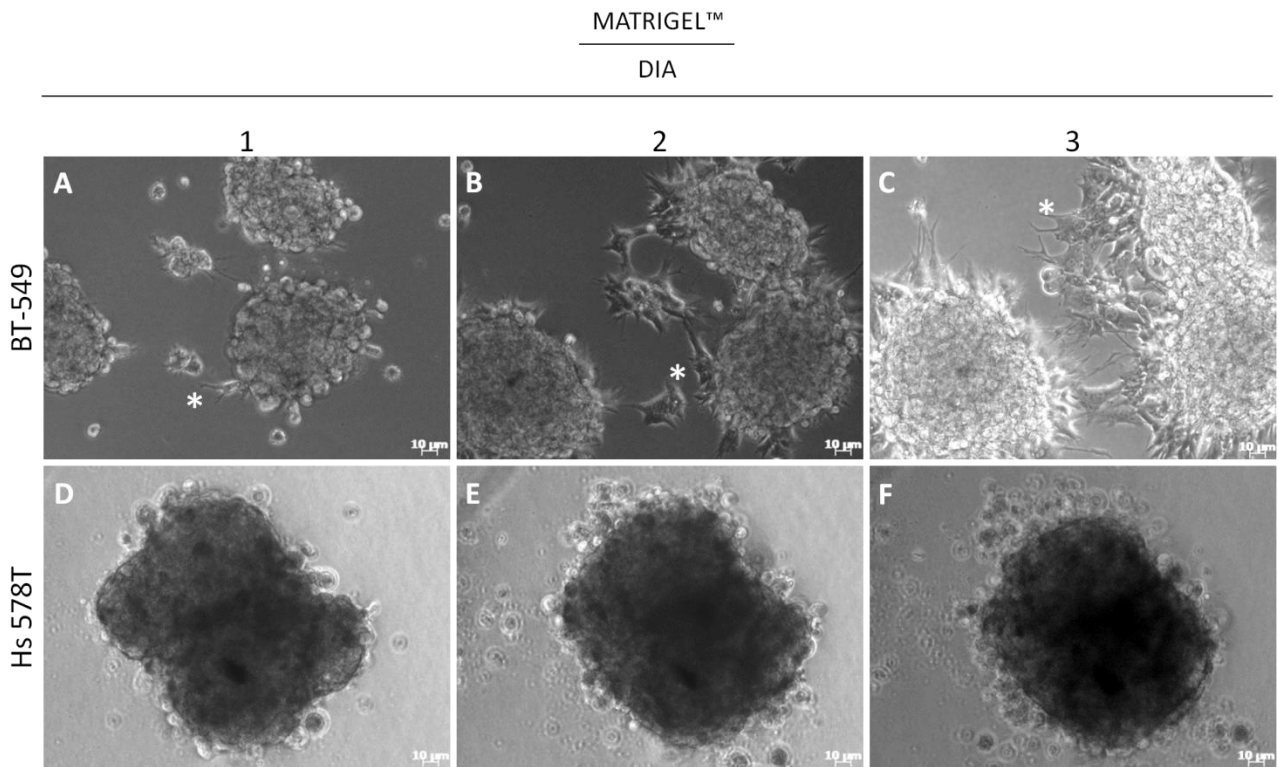
A linhagem celular BT-549 foi cultivada também, com os diferentes meios testados para favorecimento das mamoesferas, em sistema 3D (Figura 5). Percebemos a formação de colônias de células múltiplas interligadas nos meios DMEM/F-12 (1) e DMEM/F-12 (2) desde o primeiro dia. Nos demais meios essa diferenciação também ocorreu, mas foi perdida no segundo/terceiro dia de cultivo. Entre os meios testados o DMEM/F-12 (2) foi o melhor tanto para diferenciação das mamoesferas-derivadas como para formar estruturas tridimensionais em Matrigel™.



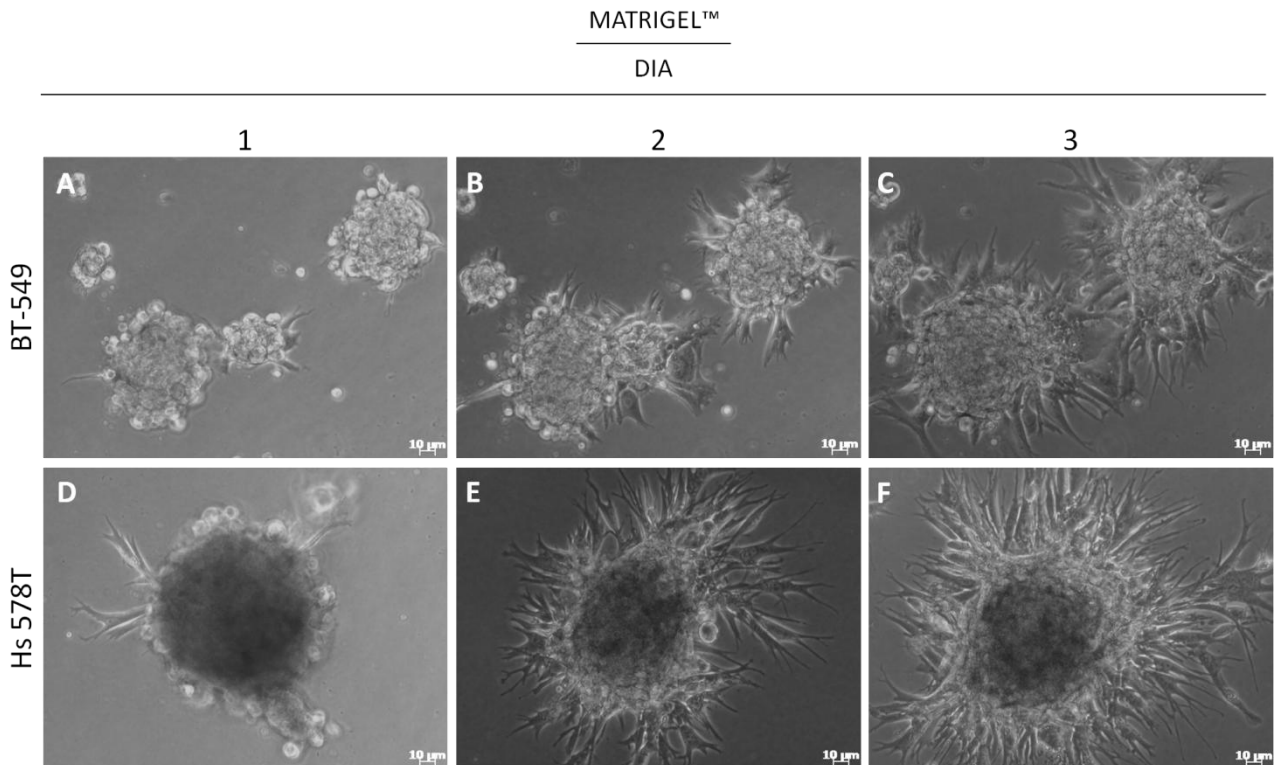
**Figura 5 - Cultivo da linhagem celular BT-549 em Matrigel™ utilizando meios de diferenciação (formação) das mamoesferas por três dias. (A a D):** Cultura em meio MEM-NEA mostrando a células no primeiro dia tentando se diferenciar, mas a partir do segundo dia ela perde essa organização e apresenta crescimento em monocamada. (E a H) Cultura em meio DMEM/F-12 (1) mostrando as células formando estruturas tridimensionais desde o primeiro dia e no terceiro dia algumas células sem diferenciação (asterisco). (I a L) Cultura em meio DMEM/F-12 (2) mostrando células formando estruturas tridimensionais desde o primeiro dia. (M a P) Cultura em meio RPMI 1640 mostrando células formando estruturas tridimensionais no primeiro dia e perdendo essa organização a partir do segundo dia.

As mamoesferas-derivadas, após os sete dias de cultivo, foram cultivadas em Matrigel™ em meio DMEM/F-12 sem suplementação (EGF, insulina bovina, soro de cavalo e hidrocortisona) para avaliar o comportamento delas nessa matriz sem os suplementos necessários para sua diferenciação. As mamoesferas BT-549 durante os três dias de cultivo apresentaram migração de células. Já as mamoesferas Hs 578T mantiveram-se inalterada quando comparada as mamoesferas cultivadas em sistema 2D (Figura 6).

No entanto, quando as mamoesferas BT-549 e Hs 578T foram cultivadas em Matrigel™ com o meio DMEM/F-12, usado no cultivo *in vitro* das mamoesferas, ambas as linhagens apresentaram migração de células a partir das mamoesferas, como pode ser visualizado na Figura 7.



**Figura 6 - Cultivo em 3D das mamoesferas obtidas a partir das linhagens celulares BT-549 e Hs 578T cultivadas em meio DMEM/F-12 sem suplementação.** BT-549 (A a C): Observa-se migração de células a partir das mamoesferas desde o primeiro dia de cultivo (asterisco). Hs 578T (D a F): As mamoesferas permanecem inalterado nos três dias de cultivo.



**Figura 7 - Cultivo em 3D das mamoesferas obtidas a partir das linhagens celulares BT-549 e Hs 578T cultivadas em meio de DMEM/F-12 suplementado com 20ng/mL de EGF, 10μg/mL de insulina bovina, 2% de soro de cavalo e 0,5μg/mL de hidrocortisona. BT-549 (A a C):** Observa-se migração de células das mamoesferas desde o primeiro dia de cultivo. **Hs 578T (D a F):** Observa-se migração de células das mamoesferas desde o primeiro dia de cultivo. As células são mais compridas e pontiagudas do que as da BT-549.

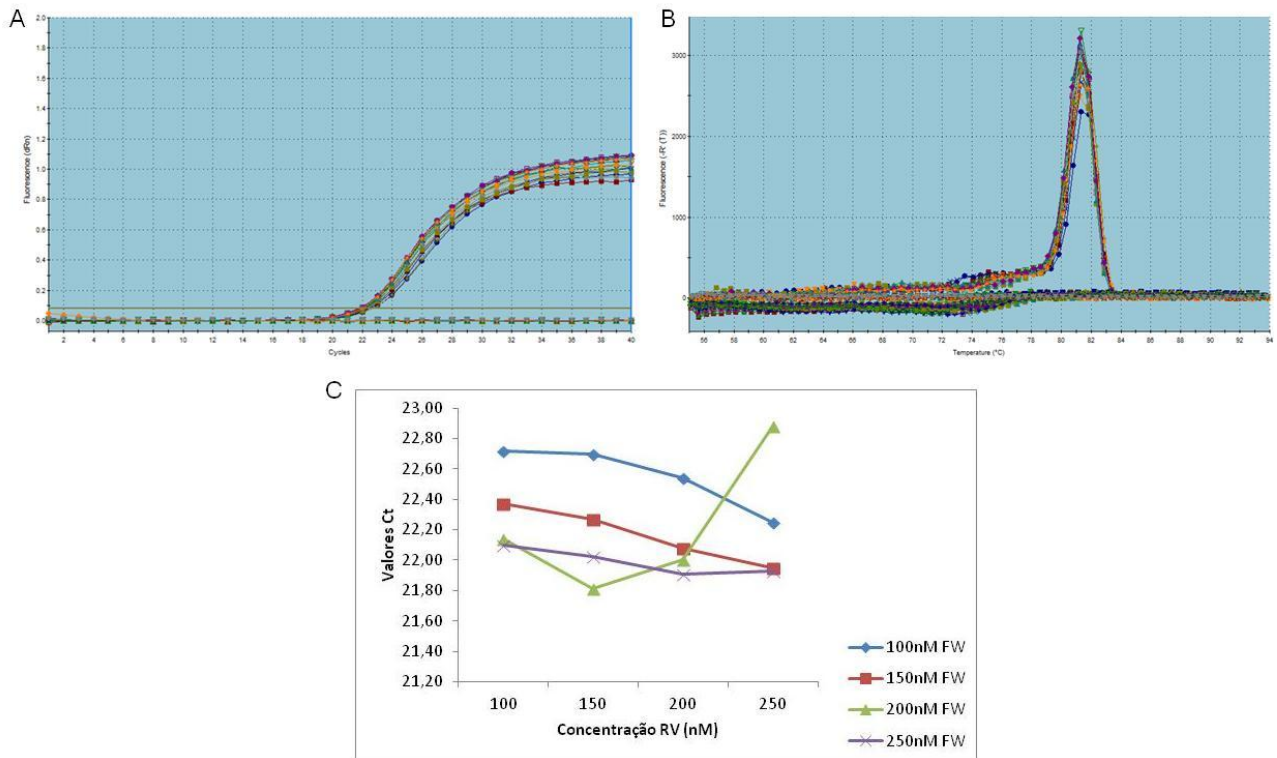
As mamoesferas Hs 578T são mais densas em comparação as mamoesferas BT-549, o que torna a visualização das células que formam a mamoesferas muito mais difícil (dados da morfologia das mamoesferas no artigo 2). DONTU e colaboradores (2003) demonstraram que as mamoesferas expressam componentes da matriz extracelular (MEC). Assim, nós especulamos que as mamoesferas Hs 578T também devem secretar e depositar proteínas da MEC em maior quantidade que a mamoesferas BT-549. Talvez essas proteínas da MEC em maior abundância da mamoesferas Hs 578T dificultem a migração de células a partir delas. Quando as mamoesferas são cultivadas em meio DMEM/F-12 (EGF, insulina bovina, soro de cavalo e hidrocortisona) no Matrigel™, provavelmente a ação desses suplementos nas células permitiu sua migração.

Assim, o meio DMEM/F-12 usado no cultivo das mamoesferas-derivadas foi o meio escolhido para o cultivo das mamoesferas em Matrigel™ porque ele permite que as células que compõe as mamoesferas de ambas as linhagens celulares migrem.

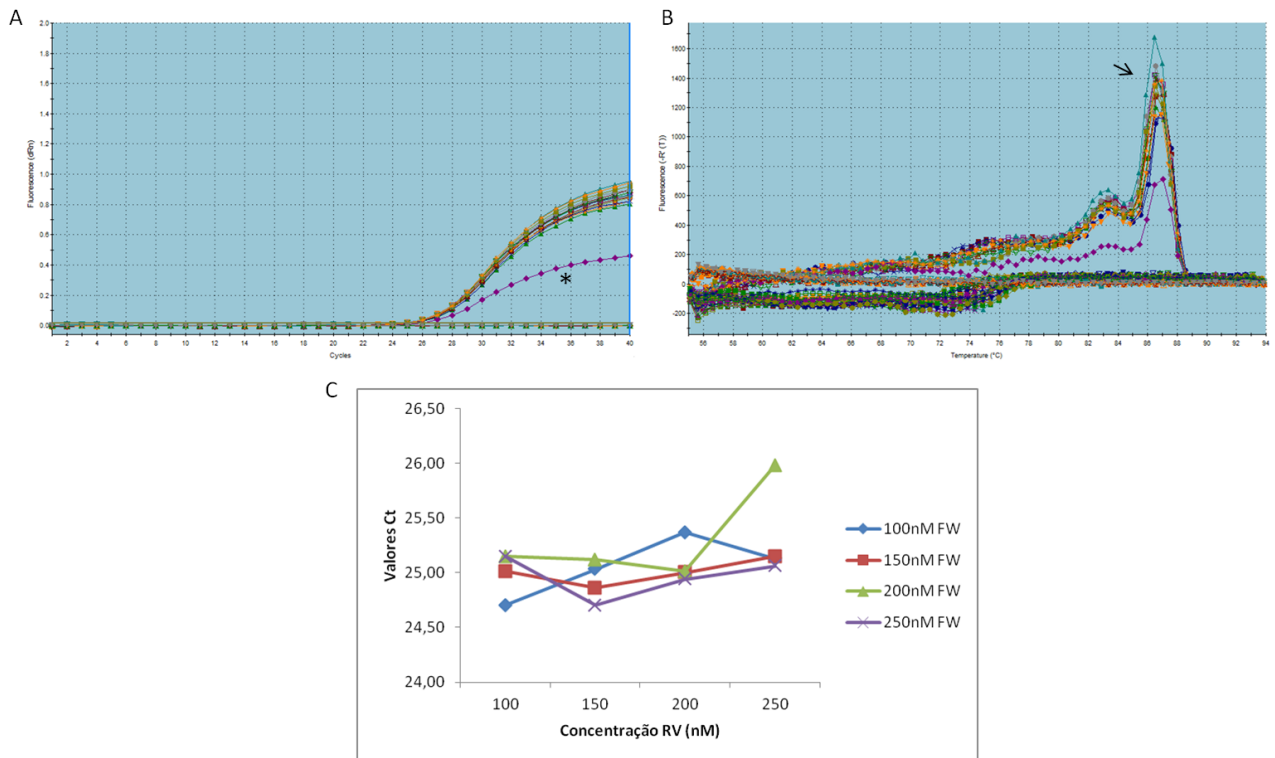
#### 4.2 Otimização da concentração dos iniciadores para os genes alvos por qRT-PCR

A concentração ideal de cada iniciador para os genes de interesse a ser usado na reação de qRT-PCR foi determinada utilizando o cDNA da linhagem celular BT-549. As concentrações testadas foram feitas fixando o iniciador RV em 100nM, 150nM, 200nM e 250nM e variando o iniciador FW utilizando essas mesmas concentrações para cada concentração do RV. Cada concentração foi feita em duplicada. Foram feitos dois controles negativos para cada concentração testada, um sem cDNA (NTC) e um sem a enzima transcriptase reversa (NoRT). As concentrações ideais para cada par de iniciadores baseiam-se no menor Ct (ciclo de *Threshold*) com as menores concentrações de iniciadores e com a presença de um único produto de amplificação na curva de dissociação. O valor de Ct é obtido considerando o ciclo no qual o sinal de fluorescência da amostra ultrapassa a linha de fluorescência de fundo, denominado *Threshold*. Em todos os casos, o *Threshold* foi fixado na fase exponencial da reação. A curva de amplificação da reação de otimização e a curva de dissociação para os genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *TP63*, *CDH3* podem ser observado nas Figuras 8, 9, 10,11, 12, respectivamente. O perfil térmico das reações de qRT-PCR e as concentrações otimizadas estão descritos na Tabela 4.

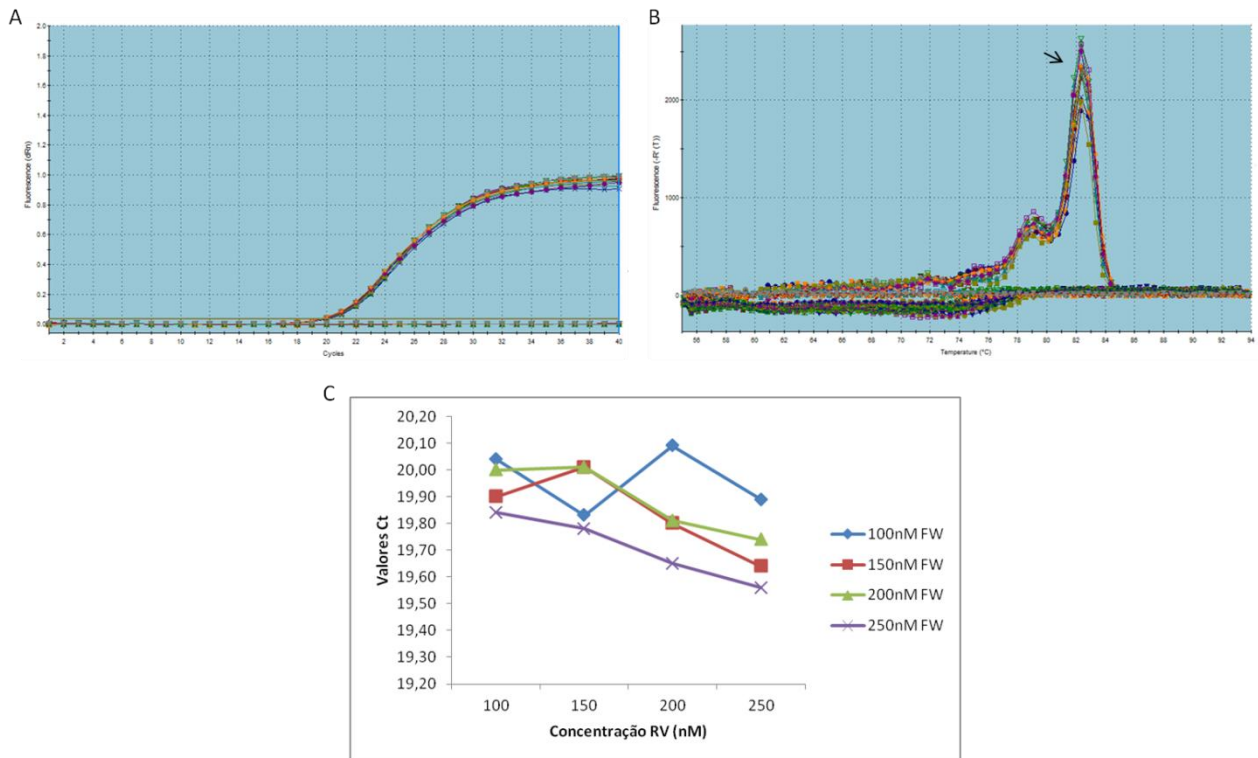




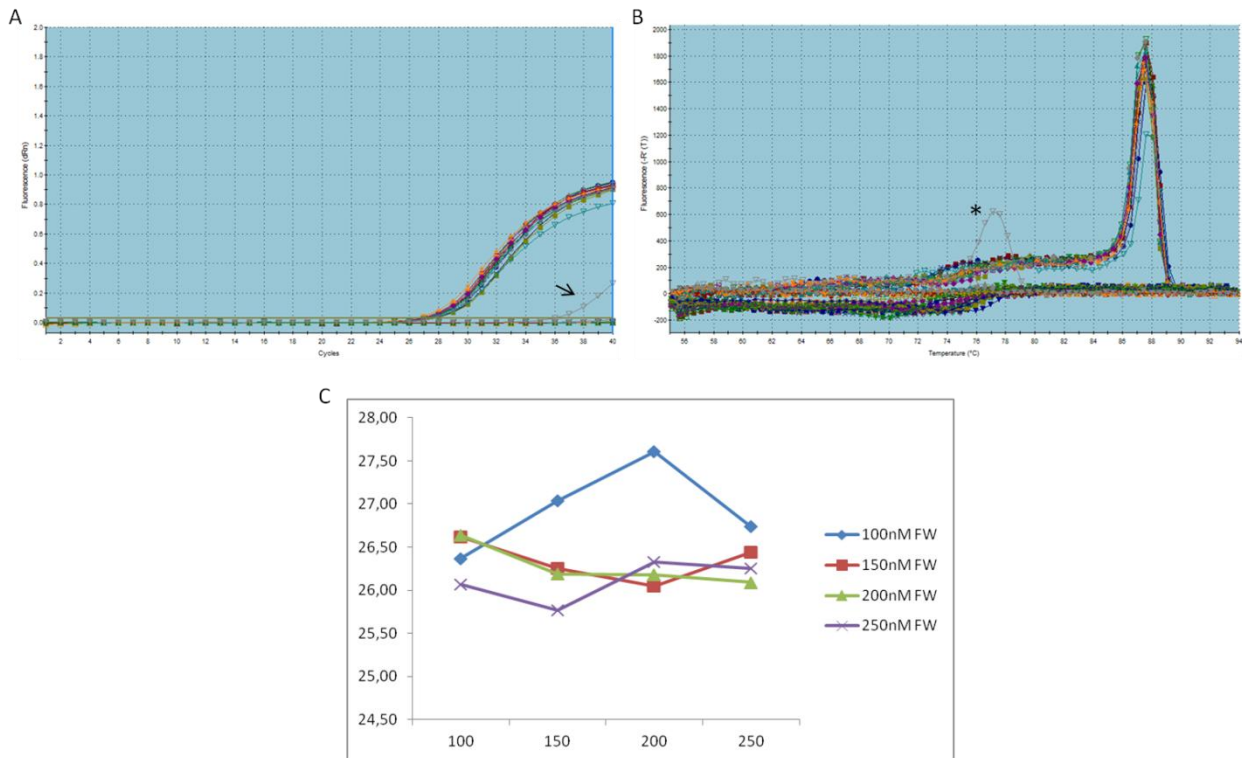
**Figura 8 - Otimização da concentração dos iniciadores do gene *ERBB2* por qRT-PCR.** (A) Curva de amplificação gênica para todas as concentrações testadas dos iniciadores. (B) Curva de dissociação da reação com a presença de um único pico de amplificação que corresponde ao produto formado em todas as concentrações testadas. (C) Observa-se o menor valor Ct obtido na concentração de 200nM FW/150nM RV.



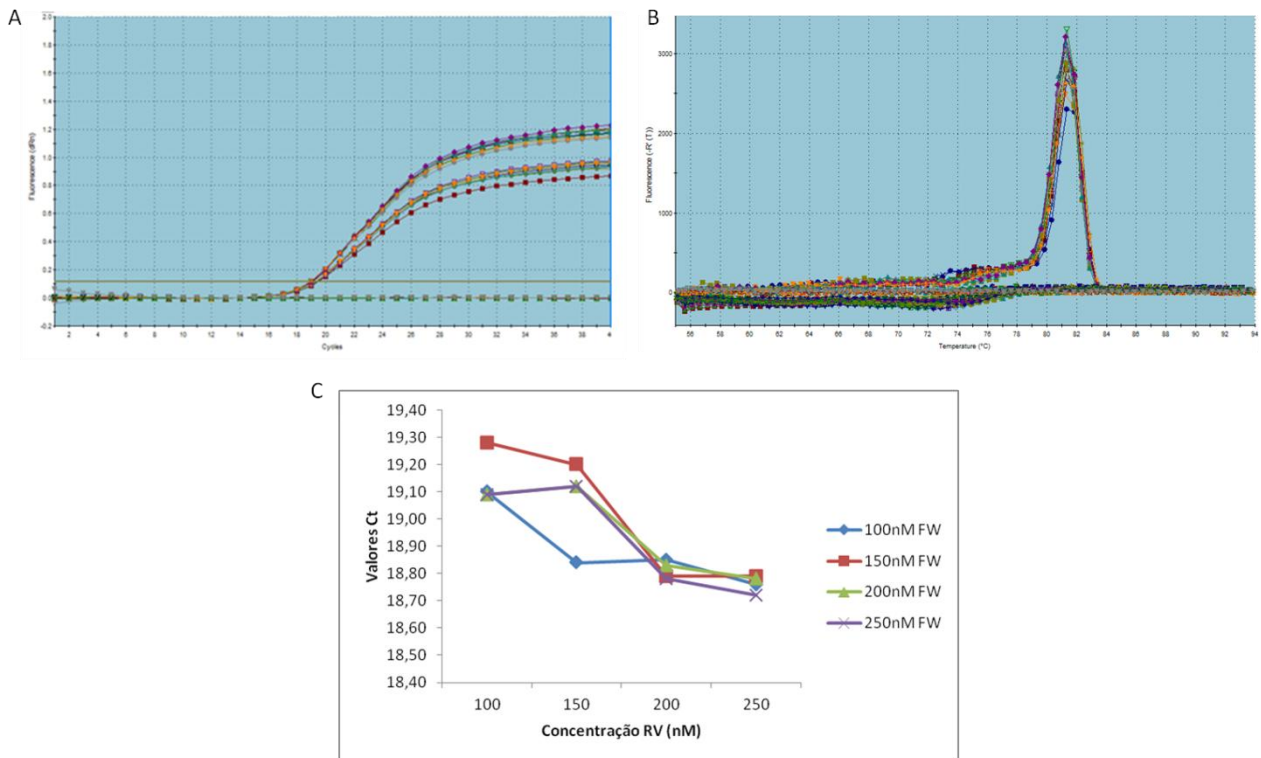
**Figura 9 - Otimização da concentração dos iniciadores do gene *KRT5* por qRT-PCR.** (A) Curva de amplificação gênica para todas as concentrações testadas dos iniciadores. Presença de amplificação tardia para uma das concentrações testadas (asterisco) (B) Curva de dissociação da reação com a presença de um pico de amplificação que corresponde ao produto formado em todas as concentrações testadas (seta). A presença do segundo pico foi associada à formação de produto não específico, mas não foi considerado significativo tendo em vista que ele aparece em todas as concentrações testadas. (C) Observa-se o menor valor Ct obtido na concentração de 250nM FW/150nM RV.



**Figura 10 - Otimização da concentração dos iniciadores do gene *MKI67* por qRT-PCR.** (A) Curva de amplificação gênica para todas as concentrações testadas dos iniciadores. (B) Curva de dissociação da reação com a presença de um pico de amplificação que corresponde ao produto formado em todas as concentrações testadas (seta). A presença do segundo pico foi associada à formação de produto não específico, mas não foi considerado significativo tendo em vista que ele aparece em todas as concentrações testadas. (C) Observa-se o menor valor Ct obtido na concentração de 250nM FW/250nM RV.



**Figura 11 - Otimização da concentração dos iniciadores do gene *TP63* por qRT-PCR.** (A) Curva de amplificação gênica para todas as concentrações testadas dos iniciadores. Presença de amplificação tardia da amostra controle NTC (seta) (B) Curva de dissociação da reação com a presença de um único pico de amplificação que corresponde ao produto formado em todas as concentrações testadas. A presença de um pequeno pico (asterisco), correspondente a amostra controle NTC, foi associada à dimerização dos iniciadores (temperatura inferior a 78°C) (C) Observa-se o menor valor Ct obtido na concentração de 200nM FW/150nM RV.



**Figura 12 - Otimização da concentração dos iniciadores do gene *CDH3* por qRT-PCR.** (A) Curva de amplificação gênica para todas as concentrações testadas dos iniciadores. (B) Curva de dissociação da reação com a presença de um único pico de amplificação que corresponde ao produto formado em todas as concentrações testadas. (C) Observa-se o menor valor Ct obtido na concentração de 250nM FW/250nM RV.

Tabela 4 - Concentrações otimizadas dos iniciadores e o perfil térmico das reações de qRT-PCR.

Gene	Concentração otimizada dos iniciadores	Condições de temperatura	Condições da curva de dissociação
<i>ERBB2</i>	200nM FW 150nM RV	95°C/10min.; 40 ciclos de 95°C/30s., 60°C/60s., 72°C/60s.	95°C/60s., 55°C/30s., 95°C/30s.
<i>KRT5</i>	250nM FW 150nM RV	95°C/10min.; 40 ciclos de 95°C/30s., 60°C/60s., 72°C/60s.	95°C/60s., 55°C/30s., 95°C/30s.
<i>MKI67</i>	250nM FW 250nM RV	95°C/10min.; 40 ciclos de 95°C/30s., 60°C/60s., 72°C/60s.	95°C/60s., 55°C/30s., 95°C/30s.
<i>TP63</i>	250nM FW 150nM RV	95°C/10min.; 40 ciclos de 95°C/30s., 60°C/60s., 72°C/60s.	95°C/60s., 55°C/30s., 95°C/30s.
<i>CDH3</i>	250nM FW 250nM RV	95°C/10min.; 40 ciclos de 95°C/30s., 60°C/60s., 72°C/60s.	95°C/60s., 55°C/30s., 95°C/30s.
<i>TPB*</i>	300nM FW 300nM RV	95°C/10min.; 40 ciclos de 95°C/30s., 60°C/60s., 72°C/60s.	95°C/60s., 60°C/30s., 95°C/30s.

\*O gene TPB foi previamente padronizado no laboratório de Biologia Celular (Funed) pela pesquisadora Dr(a). Letícia da Conceição Braga.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos e a discussão serão apresentados de forma alternativa, como artigos científicos:

- 1) Artigo 1 - *In vitro* three-dimensional microenvironment induces differential gene expression of breast cancer biomarkers (submetido a revista Tissue & Cell - Anexo)
- 2) Artigo 2 - Mammospheres: Differential expression of genes related at breast cancer molecular classification emerges as linked to cancer stem cells markers.

## 5.1 Artigo 1

### ***In vitro* three-dimensional microenvironment induces differential gene expression of breast cancer biomarkers**

Moreira, MP <sup>1\*</sup>, Cassali, GD<sup>2</sup>, Silva, LM<sup>1</sup>

1 Laboratório de Biologia Celular, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

2 Laboratório de Patologia Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

#### **ABSTRACT**

The *in vitro* three-dimensional (3D) culture has an invaluable role in the study of cell biology because it can provide a more physiologic microenvironment than the conventional models of two-dimensional (2D) culture, much more similar to that observed *in vivo*. Therefore, the present study aimed to assess the expression of important breast cancer biomarkers in breast cancer cell lines (BT-549 and Hs 578T) in these two types of culture (plastic substrate X Matrigel™). The relative gene expression levels of the genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* and *TP63* were obtained by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results showed a differential expression of those genes when the monolayer cell lines were cultured in Matrigel™, a basement membrane matrix extracted from the Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse tumour rich in extracellular matrix proteins that is effective in cell growth and differentiation. The analysis of the genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* and *TP63* provides cues of their expression in Matrigel™ for the study of cell and molecular biology. We highlight the genes *ERBB2* and *TP63* that emerge like promising markers of cancer stem cell. These findings offer a better understanding of the biology of the breast cancer cell lines analyzed for further utilize these models in drug cancer cytotoxicity assays.

Keywords: three-dimensional culture; breast cancer; cell lines; gene expression; Matrigel™.

\*Corresponding author: Laboratório de Biologia Celular, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias. Rua Conde Pereira Carneiro, 80. Gameleira. Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 30510-010, Brasil. Tel.: +55 31 3314 4746.

E-mail address: mipmoreira@gmail.com (Milene P Moreira)



## 1. Introduction

Breast cancer is the most frequent cancer in women worldwide with an estimated 296,98 new cases in 2013 (American Cancer Society, 2003). It is a heterogeneous disease with distinct subtypes each one associated with differences in clinical implications, evolution, therapeutic response and molecular profile (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). The hormone receptors (estrogen and progesterone) and the human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2) are used in routine clinical management of patients with breast cancer (Allred et al., 2010). They are very important to determined patients treatment and outcome (Slamon et al., 2001). The markers Ki-67, p53, vascular markers, p63, cytokeratin 5 and P-cadherin has also been used (Fitzgibbons et al., 2000; Matos et al., 2005; Millar et al., 2011; Fasching et al., 2011; Paredes et al., 2005).

Glandular organs, such as the mammary gland, are embedded in a stroma and extracellular matrix (Weigelt and Bissell, 2008). The extracellular matrix, a complex three-dimensional network of molecules (collagen, fibronectin, laminin and glycosaminoglycans), provide structural support and signals that regulate tissue integrity. The cell-cell and cell-extracellular matrix interaction, together with signaling molecules are import in the homeostasis regulation and tissue phenotype (Bissell et al., 1982; Bissel and Radisky, 2001; Bissell et al., 2002). Consequently *in vitro* studies in two-dimensional (2D) plastic substrate culture result in loss of morphology and tissue-specific function (Weigelt and Bissell, 2008).

Nowadays, three-dimensional (3D) *in vitro* models have become very important in the studies of normal and malignant development and molecular studies in the search of new therapeutic targets and in the screening of new therapeutic drugs in cancer (Weigelt and Bissell, 2008). Kenny et al. (2007) correlated gene expression profile of breast cancer cells line with the morphology. For example, they demonstrated that cells isolated from tumor metastases showed a reduced cell-cell adhesion in 3D culture forming colonies with cells less closely associated. Non-malignant and cancer cell can easily be distinguished in 3D culture because the first form polarized, growth-arrest structures like acinus contrasting with the disorganized architecture with loss of tissue polarity and unlimited growth observed in the cancer cell (Petersen et al., 1992; Park et al., 2006). Thus, the 3D model is capable of recapitulate the *in vivo* architecture of non-malignant cells as well of neoplastic

cells. Some authors believe that the organized structures of non-malignant cells are responsible for their resistance to chemotherapy drugs in 3D models, unlike the sensibility observed in the disorganized neoplastic cells in this type of culture. So the three-dimensional tissue architecture is capable of module drug response (Weaver et al., 2002). Fournier et al. (2006) reported that down-regulated genes in non-malignant human breast cell line cultured in 3D system (mimics the mammary gland) can be used to classify patients with good or poor prognostic. Martin et al. (2008) correlated these genes with an independent database of breast cancer patients showing that they have important value in predicts breast cancer outcome.

Taking into account the great value of 3D models in cellular signaling and morphology the present work aims to evaluate gene expression profile of important molecular markers in breast cancer (human epidermal growth factor receptor 2 (*ERBB2*), cytokeratin 5 (*KRT5*), antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (*MKI67*), P-Cadherin (*CDH3*) and tumor protein p63 (*TP63*)) in two breast cancer cell lines cultured in 3D model using Matrigel™, a basement membrane matrix extracted from the Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse tumour rich in extracellular matrix proteins, that offers a biologically active matrix that is effective for the attachment and differentiation of cells (Lacroix and Leclercq, 2004).

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Cell culture*

BT-549 (Cat. # HTB-122™) and Hs 578T (Cat. # HTB-126™) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and propagated in monolayer, respectively, in RPMI 1640 (Sigma) with 10% fetal bovine serum (Gibco), 0,10 µg/mL of bovine insulin (Sigma) and DMEM (Sigma) with 10% fetal bovine serum (Gibco), 10 µg/mL of bovine insulin (Sigma). Three-dimensional on-top culture was made according with Lee et al. (2007) in plate of 24 wells. The parental cells line were trypsinized and single cells were seeding on top of Matrigel™ (BD Bioscience), using the culture medium described above without supplementation. These cultures were maintained for 3 days. All cultures were incubated in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

## 2.2. Fluorescence *optical microscopy*

Fluorescence: The cell lines were labeled with Image-iT™ LIVE Plasma Membrane and Nuclear Labeling kit (Invitrogen), Phalloidin Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes) and the nuclei were counterstained with 4,6-diaminidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions. Image acquisition was performed using AxioVert 200 microscope (Zeiss). For 3D culture the cells were stained directly in the Matrigel™ doubling the incubation time.

Immunofluorescence: Cells were fixed with formaldehyde 4% for 1h at room temperature and washed 3 times with PBS 1X. Then the cells were pre-incubated in blocking solution (10% fetal bovine serum, 1% bovine serum albumin) for 1h at room temperature. The cells were stained with anti- $\alpha$ -Tubulin (Zymed), anti-E-Cadherin (BD) and anti-VE-Cadherin Alexa Fluor® 488 (eBioscience) at room temperature for 45 min. After incubation, cells were washed 3 times with PBS 1X and incubated with secondary antibody anti-mouse IgG (Fab specific) - FITC (Sigma) for 30 min, except for anti-VE-Cadherin. The nuclei were counterstained with DAPI 300nM for 5 min. The cells labeled with anti- $\alpha$ -Tubulin were previously permeabilized with 0,1% Triton X-100 (PlusOne). Image acquisition was performed using AxioVert 200 microscope (Zeiss). For 3D culture the cells were stained directly in the Matrigel™ doubling the incubation time.

## 2.3. RNA isolation and Quantitative PCR analysis

Total RNA was isolated from the parental cell lines using TRIzol® (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Colonies were isolated from 3D culture by enzymatic digestion with 0,46 mL/well of Dispase 10mg/mL (Gibco) for 1h/37°C followed by homogenization with TRIzol®. The concentration of total RNA and the absorbance 260/280 was measured using the NanoVue spectrophotometer (GE Healthcare). Total RNA were treated with RNase-free DNase Set (Qiagen). cDNA was synthesized using 1,0  $\mu$ g of total RNA with M-MLV Reverse transcriptase (Promega). The qRT-PCR (quantitative real-time PCR) was performed with Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) according with manufacture instructions using a Stratagene Mx3005P detection system (Agilent Technologies). Two negative controls (with no

cDNA and with no transcriptase reverse) were prepared for every set of reactions. The primers sequences used in this study are human epidermal growth factor receptor 2 (*ERBB2*) (GenBank NM\_004448; PrimerBank 4758298a3), cytokeratin 5 (*KRT5*) (GenBank NM\_000424; PrimerBank 119395753b3), antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (*MKI67*) (GenBank X65551; PrimerBank 415821a3), P-Cadherin (*CDH3*) (GenBank NM\_001793; PrimerBank 14589891a1) and tumor protein p63 (*TP63*) (GenBank AJ315499; PrimerBank 169234656c1). The concentrations of primers optimized for use were 200nM FW/150nM RV (*ERBB2*), 250nM FW/150nM RV (*KRT5* and *TP63*), 250nM FW/250nM RV (*MKI67* and *CDH3*). The PCR cycling conditions were performed as follows: 95 °C for 10 min and 40 cycles of 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 60 s and extension at 72 °C for 30 s. The values obtained were normalized using the housekeeping gene TATA box binding protein (*TBP*) (GenBank NM\_003194; Li et al., 2009) and relative expression level were calculated with the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak and Schmittgen, 2001) using as calibrator the parental cell lines.

#### 2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using REST 2009 software (Qiagen) to measure the differences between the parental cell lines in the two types of culture. A p value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1 Cell line morphology

The BT-549 cell line in two-dimensional (2D) culture presents a polymorphic population with epithelial like components and multinucleated giant cells (ATCC). The Hs 578T cell line in monolayer presents a mixed polygonal morphology and a stellate cell type with aggregates of casein protein granules (ATCC) and a nucleus-cytoplasm ratio greater than the BT-549 (Fig. 1A). Both cell lines studied when cultured in 2D grown in monolayer, in a disorganized manner, appearing to be overlapping one under the other, giving the impression of cells growing in different planes (Fig. 1A). The expression of important molecules involved in the organization and cellular

adhesion ( $\alpha$ -tubulin, E-cadherin and VE-cadherin) showed that the two cell lines express  $\alpha$ -tubulin and did not express E-cadherin or VE-cadherin (Fig. 1B) in 2D culture.

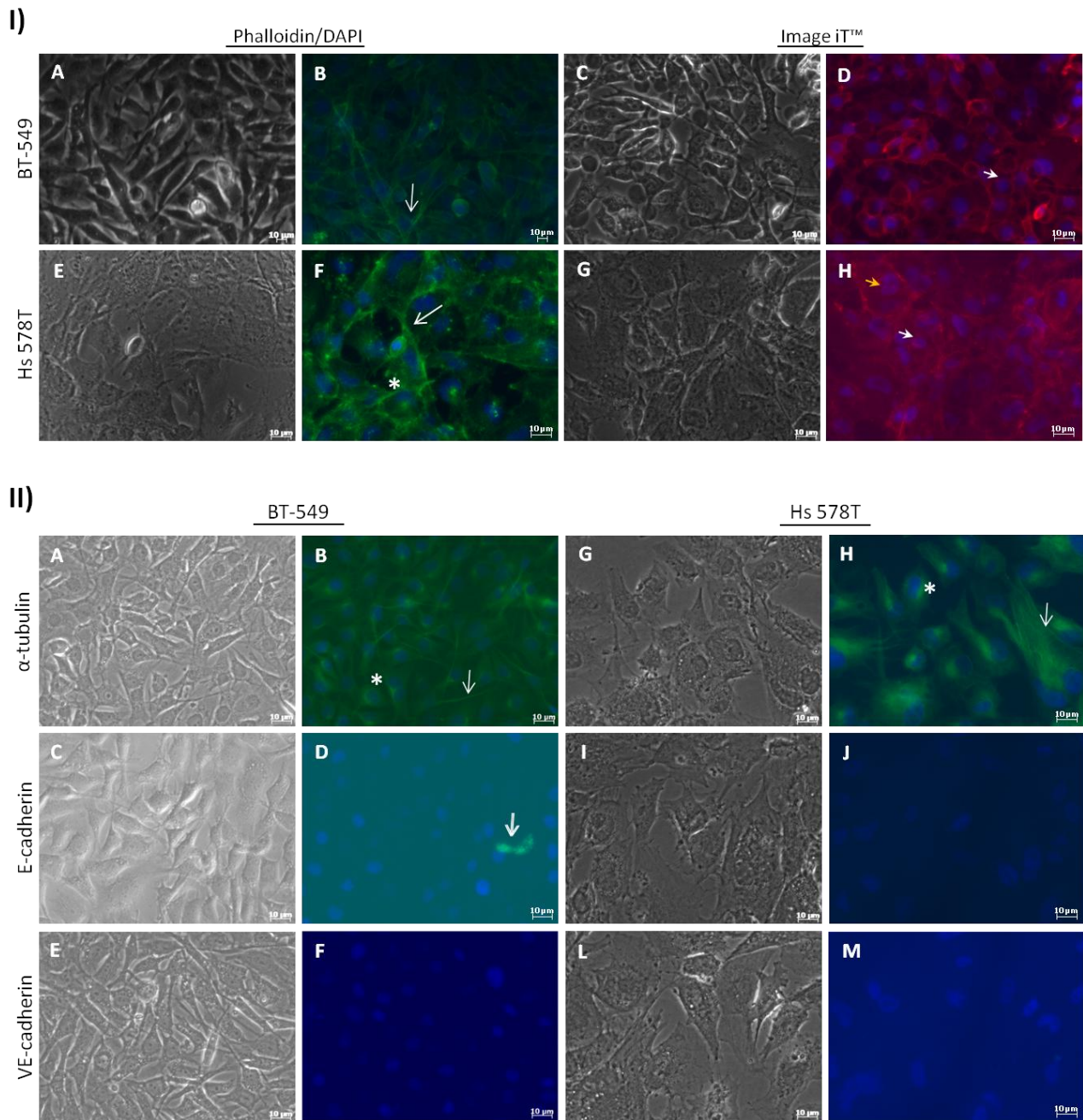


Fig. 1 - BT-549 and Hs 578T cell lines growing in 2D culture. I) The cell lines BT-549 (A a D) and Hs 578T (E a H) were stained with Phalloidin/DAPI (green/blue) and Image iT™ (red/blue). The differential interference contrast (DIC) images are represented in A, C for BT-549 and E, G for Hs 578T. Actin stained in cytoplasmic projections (white arrow) and peripherally to the plasma membrane (asterisk). Small and spherical nuclei of BT-549 cell (white arrow) and polymorphic nuclei of Hs 578T cell (spherical - with arrow; reniform - orange arrow). II) Expression of  $\alpha$ -tubulin, E-cadherin and VE-cadherin in BT-549 (A a F) and Hs 578T (G a M) cell lines. BT-549: (A, B) Perinuclear marking of  $\alpha$ -tubulin (green) with focal points strongly stained (asterisk) and the cytoplasmic projections (arrow). (C, D) No marking for E-cadherin in the plasma membrane and nonspecific extracellular markers (arrow).

(E, F) Absence of VE-cadherin marking, confirmed by the presence of only labeled nuclei. Hs 578T: (G, H) Diffuse marking of  $\alpha$ -tubulin (arrow) and more intense that observe for BT-549 and with focal points strongly stained (asterisk); (I, J) Absence of E-cadherin; (L, M) Absence of VE-cadherin.

In three-dimensional (3D) culture with the Matrigel™, the BT-549 cell line, after three days, showed a invasive phenotype, with stellate projections that often creates bridges between multiple cell colonies (Kenny et al., 2007) (Fig. 2A). The Hs 578T cell line presented a structure tubular-like with multiple ramifications and multiple cell colonies (Fig. 2A). Both cells were able of differentiation in complex three-dimensional structures. The cellular architecture of the structures formed on Matrigel™ is also visualized in Figure 2A through labeled with Phalloidin/DAPI and Image iT™. Analysis of expression of  $\alpha$ -tubulin, E-cadherin and VE-cadherin in 3D culture showed that only the  $\alpha$ -tubulin is expressed and only in BT-549 (Fig. 2B).



Fig. 2 - BT-549 and Hs 578T cell lines in 3D culture (Matrigel™). I) BT-549 cell (A a G): The cells were organized, juxtaposed and aligned from 2 days. Asterisk indicates stellate projections and arrow indicate bridges between multiple cell colonies. It shows high level of actin filaments in the multiple cell colonies (dotted arrow) through label with Phalloidin/DAPI (green/blue) and Image iT™ (red/blue) label shows is very organized. Hs 578T cell (H a N): The cells form multiple cell colonies and branching from day 1 (arrow). After label with Phalloidin/DAPI and Image iT™ is possible visualize a homogeneous distribution of actin filaments and the morphology delimitation. II)  $\alpha$ -tubulin, E-cadherin and VE-cadherin stained in BT-549 and Hs 578T cell lines. BT-549: (A, B) The cells exhibit marking for  $\alpha$ -tubulin in multiple cell colonies (arrow). (C, D) No labeling for E-cadherin at the plasma membrane, with some nonspecific extracellular markings (asterisk). (E, F) Absence of VE-cadherin. Hs 578T: (G a M) This cell did not show labeling for any of the molecules ( $\alpha$ -tubulin, E-cadherin and VE-cadherin), with some nonspecific extracellular markings (arrow and asterisk).

### 3.2 Gene expression analysis

The analysis of the relative levels of gene expression showed that the genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67* and *CDH3* presented a differential expression when the cell lines were cultured in Matrigel™ (Fig. 3) compared with the 2D culture. The gene *ERBB2* were up-regulated by 3.41-fold for BT-549 ( $p = 0.000$ ) and 3.75-fold for Hs 578T ( $p = 0.000$ ). In Hs 578T cell line the gene *KRT5* was up-regulated (0.66-fold;  $p = 0.000$ ) and *TP63* showed a small increase (0.95-fold;  $p = 0.509$ ) while in BT-549 cultured in 3D both genes showed no amplification. The gene *MKI67* showed an increase in their expression in BT-549 (1.16-fold;  $p = 1.000$ ) and down-regulated in the Hs 578T (-2.9-fold;  $p = 0.000$ ). The BT-549 cell line showed to be up-regulated for *CDH3* (3.98-fold;  $p = 0.000$ ) and the expression of this genes in Hs 578T cell line showed a small increase (0.25-fold;  $p = 0.491$ ). In summary the gene *MKI67* for BT-549 and the genes *CDH3* and *TP63* for Hs 578T showed no statistically significant differences between the two types of cultures (2D x 3D).



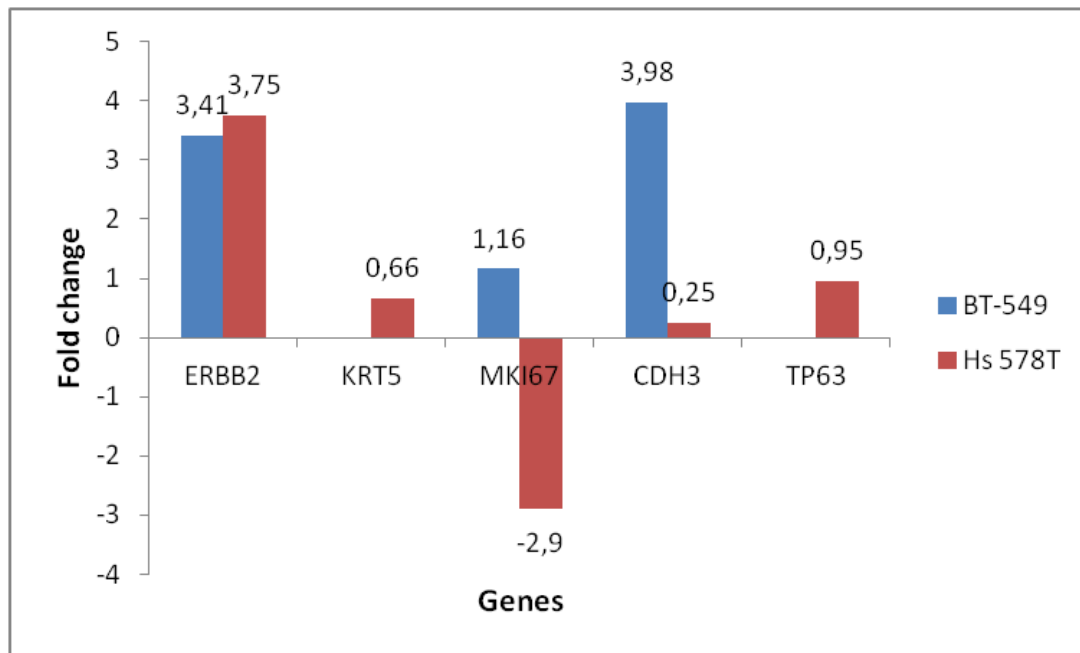


Fig. 3 - Relative gene expression of BT-549 and Hs 578T cell lines in 3D culture. Relative gene expression levels of the genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* and *TP63* in BT-549 and Hs 578T cell lines showed a differential expression when both cell lines were cultured in Matrigel™ when the 2D culture was considered as the calibrator. The gene *KRT5* and *TP63* showed no amplification in the 3D culture for the cell line BT-549.

#### 4. Discussion

Breast cancer is the second leading cause of cancer death among women worldwide, exceeded only by lung cancer, with an estimated 39.620 breast cancer deaths in 2013 (American Cancer Society, 2013), probably because is generally diagnosed at an advanced stage (WHO, 2010). *In vivo* models offer a relevant physiological environment to study carcinogenesis and drug screening, but they are limited in yields and are difficult to dissect biochemically (Jacks and Weinberg, 2002), further the ethical issue involved. The 2D *in vitro* models create an environment that differs markedly from the breast microenvironment (Vargo-Gogola and Rosen, 2007), so they do not provide the optimal system for fully understanding how the regulation of proliferation, cell death and differentiation influence the form in the normal state and during tumor formation (Bissel and Radisky, 2001; O'Brien et al., 2002). Therefore, 3D models have the advantage of mimic the *in vivo* interactions providing the appropriate structural and functional context for study the cancer

genes (Debnath et al., 2003) being a powerful alternative way to perform genetic and biochemical analysis (Jacks and Weinberg, 2002).

We showed through morphological analysis that both cells, BT-549 and Hs 578T, exhibit a distinctive morphology in 3D culture like observed by Kenny et al., 2007 (Fig. 2). The differences in the actin filaments distribution observed between the cell lines were probably responsible for the organization and architecture of each cell exhibited in 3D culture. The absence of the adhesion molecules (E-cadherin and VE-cadherin) implies in the loss of the phenomenon known as contact inhibition, which allows cells to grow in a disorganized way and overlapped on each other as shown in Fig. 1. The lack of expression of  $\alpha$ -tubulin in the Hs 578T cell line cultured in 3D can be due changes in GTPase activity that helps in the formation of microtubules. The tubulin cytoskeleton is responsible for microtubules formation being formatted by two subunits  $\alpha$  e  $\beta$ . Due to the importance of these molecules in adhesion and cell division they became target of anti-cancer drugs, since alterations in their expression may confer resistance to therapy.

Using qRT-PCR we investigated the expression of the genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* and *TP63* in the BT-549 and Hs 578T cell lines cultured in monolayer and in Matrigel™. We observed that all genes showed a differential expression in the cell lines cultured in 3D compared with the cells cultured in 2D, except the gene *KRT5* and *TP63* in the BT-549 cell line that showed no amplification in the 3D culture (Fig. 3). Statistical differences were observed between the cell lines cultured in Matrigel™ when the 2D culture was considered as the calibrator for the genes *ERBB2*, *MKI67* and *CDH3* for the BT-549 and for the genes *ERBB2*, *KRT5* and *MKI67* for Hs 578T. The expression observed for the gene *ERBB2* in BT-549 and Hs 578T cell lines contradicts with others authors (Neve et al., 2006; Kao et al., 2009) that showed that those cells did not express this gene. The reliability of our data was guaranteed by the fact that all primers had they authenticity certified by the Primer-BLAST tool ensuring that they are able to specifically recognize the target gene.

It is important to note that other authors demonstrated that gene expression of cells growing in monolayer cultures differ significantly from those in three-dimensional (3D) cultures. Weigelt et al. (2010) showed that the microenvironment regulates the signal transduction pathway activation

downstream of HER-2 and this influenced in anti-HER2 drug response observed in HER2-amplified breast cancer cell lines cultured in 2D and 3D. Pickl and Ries (2009) also showed an increased in *ERBB2* expression when the cells were cultured in 3D which corroborates with our data. The gene *ERBB2* is a proto-oncogene involved in cell growth, differentiation, apoptosis and metastasis (Yarden and Sliwkowski, 2001). The up-regulation of the protein HER-2 is found in approximately 18-20% of the mammary carcinomas (Slamon et al., 1987; Burstein et al., 2005), being associated with aggressive tumor (Burstein et al., 2005; Wolff et al., 2007). The Matrigel™ is effective for cell growth and differentiation, as can be visualized in Fig. 2. The overexpression of *ERBB2* has been associated with increase of the stem/progenitor cells populations (Korkaya et al. 2012), demonstrating that the cell lines BT-549 ( $p = 0.000$ ) and Hs 578T ( $p = 0.000$ ) could possess a population of undifferentiated cells required in the differentiation process observed.

The gene *TP63* is a member of the tumor suppressor gene p53 family highly expressed in the basal layer of epithelial tissues, involved in the development of these tissues through the maintenance of progenitor cell populations (Yang et al., 1998, 1999). This gene regulates the expression of several genes involved in cell cycle, cell death, cell proliferation and adhesion molecules (Yang et al., 2006). *In vitro* assays with mesenchymal stem cells derived from human bone marrow showed that the expression of p63 protein is induced by chemotherapeutic drugs and its inhibition leads to chemoresistance and decreased apoptosis (Lu et al., 2011), therefore, p63 status could be used as a predictor of cell resistance. The no amplification of *TP63* observed in 3D culture of the cell line BT-549 could be due the tumor cell origin from an invasive tumor, characterized as a tumor that lost the basal layer of myoepithelial cells, being this gene a marker of myoepithelial cell (Stefanou et al., 2004). The cell line Hs 578T was derived from a carcinosarcoma, a mixed tumor consisting of epithelial and myoepithelial cells without a transition zone between the two elements (Tokudome et al., 2005). The down-regulation of this gene was associated with the epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Higashikawa et al., 2007). So the increase of this gene expression in the Hs 578T cell line ( $p= 0.509$ ) in the Matrigel™ could mean that this cell line do not undergoes EMT process. The Hs 578T is epithelial in origin and so the

expression observed of the gene TP63 might mean a contamination of the cell line with myoepithelial cells.

Cytokeratins are intermediate filament proteins of the cytoskeleton expressed in all epithelial tissues (Moll et al., 2008). The gene *KRT5* encode the protein cytokeratin 5 that is found in basal and myoepithelial cells of glandular tissues, like the breast, and changes in their expression is associated with an unfavorable prognosis (Karantza, 2011). The BT-549 cell line cultured in 3D showed no amplification of this gene in 3D culture. This could be due to the fact that this cell line was derived from an invasive tumor which lost the basal layer of myoepithelial cells. Romano et al. (2009) demonstrated that *TP63* regulates the expression of basal cytokeratins, like CK5 and CK14. Yang et al. (1999) showed that mouse *p63*<sup>-/-</sup> do not express de CK5, which could be another explanations for the absence of CK5 in the BT-549 cultured in 3D. However the loss of expression of the gene *KRT5* as well as the gene *TP63* in the BT-549 cell line in 3D culture must be confirmed by immunohistochemistry analyses. For the Hs 578T cell line cultured in 3D compared with the 2D culture the *KRT5* gene was up-regulated ( $p = 0.000$ ). As culture in monolayer result in loss of morphological organization and tissue specific function (Weigelt and Bissell, 2008), the reestablishment of the cell-matrix interactions provided by the Matrigel™ mimics the *in vivo* features. So the 2D expression data for BT-549 and Hs 578T could represent false-positive results.

The nuclear protein Ki-67, encoded by the gene *MKI67*, is associated with cell proliferation, being expressed in all phases of the cell cycle, except in resting cells (G0) (Gerdes et al., 1984). The high expression of this gene is correlated with relapse and low survival in breast cancer patients (Azambuja et al., 2007). This gene showed an increase in their expression in the BT-549 ( $p = 1.000$ ) and a down-regulation in the Hs 578T ( $p = 0.000$ ) cultured in 3D compared with the 2D culture. Debnath et al. (2002) and Coppock et al. (2007) showed a balance between proliferation and apoptosis in the formation and maintenance of acinus in mammary epithelial cells in 3D culture. So the cell lines studied by us may be in different stage of differentiation of the 3D structures. Or this could be a feature of the proliferation rate of the tumors that originated these cell lines.

The cadherins, like P-cadherin encoded by the gene *CDH3*, are calcium-dependent protein located in adherent junctions that mediate cell-cell adhesion (Labelle et al., 2008). P-cadherin is expressed in the basal layer (Shimoyama et al., 1989) suggesting its role in differentiation and growth (Gamallo et al., 2001), since this layer is considered the stem cell compartment of the breast (Taylor-Papadimitriou et al., 1989). So the up-regulation of this gene in the BT-549 ( $p = 0.000$ ) cultured in 3D is compatible with the formation of 3D structures on Matrigel™, like we can see in Figure 2. For Hs 578T this gene also showed an increase in their expression although no statistical difference was observed ( $p = 0.491$ ).

The genes *ERBB2* and *TP63*, as already described, were linked with the stem cell population (Korkaya et al., 2008; Yang et al., 1998, 1999) and so they may also be involved in the persistence of cancer stem cells. There are increasing evidence showing that these cells are responsible for sustaining tumorigenesis, tumor resistance to conventional cancer therapies and relapse (Reya et al., 2001; Visvader and Linderman, 2008; Dean et al., 2005; Phillips et al., 2006; Li et al., 2008; Zhou et al., 2009; Lee et al., 2011)

Individualized analysis of the genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* and *TP63* provides cues of their expression in relevant physiological environment (Matrigel™) for the study of cell and molecular biology. Due to the great importance of the genes *TP63* and *ERBB2* on cell and tumor biology we believe that a better knowledge of these genes in a matrix, like the Matrigel™, capable of recapitulate in culture the growth behavior as well as structural and functional differentiation characteristics of the cells *in vivo* (Petersen et al., 1992) will be a breakthrough in cancer research field. In this paper we became to understand the biology of the breast cancer cell line BT-549 and Hs 578T in 3D culture for further utilize these models in cytotoxicity assay in the search for new cancer drugs and biomarkers that could be used in the diagnosis, prevention and treatment of breast cancer patients.

## Acknowledgements

This work was financially supported by the Brazilian Agencies, FAPEMIG and CNPq. The authors would like to thank Josiane Barbosa Piedade (Fundação Ezequiel Dias) the valuable technical help.

## Conflict of interest statement

None.

## References

- Allred D.C., 2010. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol.* 23 Suppl 2,S52-9.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2013*. Atlanta: American Cancer Society. 2013.
- American Type Culture Collection (ATCC). Disponível em: <http://www.atcc.org/>.
- de Azambuja E., Cardoso F., de Castro G. Jr., Colozza M., Mano M.S., Durbecq V., Sotiriou C., Larsimont D., Piccart-Gebhart M.J., Paesmans M., 2007. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 96, 1504-1513.
- Bissell M.J., Hall H.G., Parry G., 1982. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. theor. Biol.* 99(1),31-68.
- Bissell M.J., Radisky D., 2001. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1(1), 46-54.
- Bissell M.J., Radisky D.C., Rizki A., Weaver V.M., Petersen O.W., 2002. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* 70, 537–546.
- Burstein H.J., 2005. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med.* 353(16),1652-1654.
- Coppock H.A., Gilham D.E., Howell A., Clarke R.B., 2007. Cyclin-dependent kinase inhibitors and basement membrane interact to regulate breast epithelial celldifferentiation and acinar morphogenesis. *Cell Prolif.* 40(5), 721-740.
- Debnath J., Mills K.R., Collins N.L., Reginato M.J., Muthuswamy S.K., Brugge J.S., 2002. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressingmammary acini. *Cell* 111(1), 29-40.
- Debanath J., Muthswamy S.K., Bruge J.S., 2003. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods.* 30(3), 256-268.
- Dean M., Fojo T., Bates S., 2005. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5(4), 275-284.

Fasching P.A., Heusinger K, Haeberle L., Niklos M., Hein A., Bayer C.M., Rauh C., Schulz-Wendtland R., Bani M.R, Schrauder M., Kahmann L., Lux M.P., Strehl J.D., Hartmann A., Dimmler A, Beckmann M.W., Wachter D.L., 2011. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer* 11, 486.

Fitzgibbons P.L, Page D.L., Weaver D., Thor A.D., Allred D.C., Clark G.M., Ruby S.G., O'Malley F., Simpson J.F., Connolly J.L., Hayes D.F., Edge S.B., Lichter A., Schnitt S.J., 2000. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol Lab Med.*124, 966-978.

Fournier M.V., Martin K.J., Kenny P.A., Xhaja K., Bosch I., Yaswen P., Bissell M.J., 2006. Gene expression signature in organized and growth-arrested mammary acini predicts good outcome in breast cancer. *Cancer Res.* 66(14), 7095-7102.

Gamallo C., Moreno-Bueno G., Sarrió D., Calero F., Hardisson D., Palacios J., 2001. The prognostic significance of P-cadherin in infiltrating ductal breast carcinoma. *Mod Pathol.* 14(7), 650-654.

Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H.H., Schwab U, Stein H., 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 133(4),1710-1715.

Higashikawa K., Yoneda S, Tobiume K., Taki M., Shigeishi H., Kamata N., 2007. Snail-induced down-regulation of  $\delta$ Np63 $\alpha$  acquires invasive phenotype of human squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 67(19), 9207-9213.

Jacks T., Weinberg R.A., 2002. Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. *Cell* 111(7), 923-925.

Kao J., Salari K., Bocanegra M., Choi Y.L., Girard L., Gandhi J., Kwei K.A., Hernandez-Boussard T., Wang P., Gazdar A.F., Minna J.D., Pollack J.R., 2009. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One* 4(7), 1-16.

Karantza V., 2011. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 30(2), 127–138.

Kenny P.A., Lee G.Y., Myers C.A, Neve R.M., Semeiks J.R., Spellman P.T., Lorenz K., Lee E.H., Barcellos-Hoff M.H., Petersen O.W., Gray J.W., Bissell M.J., 2007. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* 1(1), 84–96.

Korkaya H., Paulson A., Iovino F., Wicha M.S., 2008. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* 27(47), 6120-6230.

Labelle M., Schnittler H.J., Aust D.E., Friedrich K., Baretton G., Vestweber D., Breier G., 2008. Vascular endothelial cadherin promotes breast cancer progression via transforming growth factor  $\beta$  signaling. *Cancer Res.* 68, 1388-1397.

Lacroix M., Leclercq G., 2004. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.* 83(3),249-89.

Lee G.Y., Kenny P.A., Lee E.H., Bissell M.J., 2007. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods.* 4(4), 359–365.

- Lee H.E., Kim J.H., Kim Y.J., Choi S.Y., Kim S.W., Kang E., Chung I.Y., Kim I.A., Kim E.J., Choi Y., Ryu H.S., Park S.Y., 2011. An increase in cancer stem cell population after primary culture systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 104(11), 1730-1738.
- Li Y.L., Ye F., Hu Y., Lu W.G., Xie X., 2009. Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 394, 397.
- Li X., Lewis M.T, Huang J., Gutierrez C., Osborne C.K., Wu M.F., Hilsenbeck S.G., Pavlick A., Zhang X., Chamness G.C., Wong H., Rosen J., Chang J.C., 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 100(9), 672-679.
- Livak, K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Lu C., Lu S., Liang W., Li J., Dou X., Bian C., Shi D., Liao L., Zhao R.C., 2011. Tap63 $\alpha$  mediates chemotherapeutic agent-induced apoptosis in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 20(8), 1319-1326.
- Matos I., Dufloth R., Alvarenga M., Zeferino L.C., Schmitt F., 2005. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinoma. *Virchows Arch.* 447, 688-694.
- Martin K.J., Patrick D.R., Bissell M.J., Fournier M.V., 2008. Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets. *Plos One* 3(8), e2994.
- Millar E.K., Graham P.H., McNeil C.M., Browne L., O'Toole S.A., Boulghourjian A., Kearsley J.H., Papadatos G., Delaney G., Fox C., Nasser E., Capp A., Sutherland R.L., 2011. Prediction of outcome of early ER+ breast cancer is improved using a biomarker panel, which includes Ki-67 and p53. *Br J Cancer* 105(2), 272-280.
- Moll R., Divo M, Langbein L., 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 129, 705-733.
- Neve R.M., Chin K., Fridlyand J., Yeh J., Baehner .FL., Fevr T., Clark L., Bayani N., Coppe J.P., Tong F., Speed T., Spellman P.T., DeVries S., Lapuk A., Wang N.J., Kuo W.L., Stilwell J.L., Pinkel D., Albertson D.G., Waldman F.M., McCormick F., Dickson R.B., Johnson M.D., Lippman M., Ethier S., Gazdar A., Gray J.W., 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10(6), 515–527.
- O'Brien L.E., Zegers M.M., Motov K.E., 2002. Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(7), 531-537.
- Paredes J., Albergaria A., Oliveira J.T., Jerónimo C, Milanezi F., Schmitt F.C., 2005. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res.* 11, 5869-5877.
- Park C.C., Zhang H., Pallavicini M., Gray J.W., Baehner F., Park C.J., Bissell M.J., 2006. Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res.* 66(3),1526-1535.
- Perou C.M., Sørlie T, Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D., 2000. Molecular portraits of human breast tumours.



Nature 406(6797), 747-752.

Petersen O.W., Rønnov-Jessen L., Howlett A.R., Bissell M.J., 1992. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(19), 9064-9068.

Phillips T.M., McBride W.H., Pajonk F., 2006. The response of CD24<sup>(-low)</sup>/CD44<sup>+</sup> breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst.* 98(24):1777-1785.

Pickl M., Ries C.H., 2009. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene* 28(3), 461-468.

Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859), 105-111.

Romano R.A., Ortt K., Birkaya B., Smalley K., Sinha S., 2009. An active role of the DeltaN isoform of p63 in regulating basal keratin genes K5 and K14 and directing epidermal cell fate. *PLoS One* 4(5), e5623.

Shimoyama Y., Hirohashi S., Hirano S., Noguchi M., Shimosato Y., Takeichi M., Abe O., 1989. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.* 49(8), 2128-33.

Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L., 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783–792.

Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L., 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182.

Sørlie T., Perou .CM., Tibshirani R., Aas T., Geisler S, Johnsen H., Hastie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Thorsen T., Quist H., Matese J.C., Brown P.O., Botstein D., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19), 10869-10874.

Stefanou D., Batistatou A., Nonni A., Arkoumani E., Agnantis N.J. 2004. p63 expression in benign and malignant breast lesions. *Histol Histopathol.*19(2):465-471.

Taylor-Papadimitriou J., Stampfer M., Bartek J., Lewis A., Boshell M., Lane E.B., Leigh I.M., 1989. Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *J Cell Sci.* 94, 403-413.

Vargo-Gogola T., Rosen J.M., 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* 7(9), 659-72.

Visvader J.E., Lindeman G.J., 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8(10), 755-768.

Weaver V.M., Lelièvre S., Lakins J.N., Chrenek M.A., Jones J.C., Giancotti F., Werb Z., Bissell M.J., 2002. beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* 2(3), 205-216.

Weigelt B., Bissell M.J, 2008. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 18(5), 311–321.

Weigelt B., Lo A.T., Park C.C., Gray J.W., Bissell M.J., 2010. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat.* 122(1), 35-43.

Werling R.W., Hwang H, Yaziji H., Gown A.M., 2003. Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol.* 27(1), 82-90.

Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A., McShane L.M., Paik S., Pegram M.D., Perez E.A., Press M.F., Rhodes A., Sturgeon C., Taube S.E., Tubbs R., Vance G.H., van de Vijver M., Wheeler T.M., Hayes D.F., 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25(1),118-145.

World Health Organization (WHO), 2010. Global status report on noncommunicable diseases.

Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M.D., Dötsch V., Andrews N.C., Caput D., McKeon F., 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, deathinducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell.* 2(3), 305-316.

Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R.T, Tabin C., Sharpe A., Caput D., Crum C., McKeon F., 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398, 714–718.

Yang A., Zhu Z., Kapranov P., McKeon F., Church G.M., Gingeras T.R., Struhl K., 2006. Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells. *Mol Cell.* 24(4), 593-602.

Yarden Y., Sliwkowski M.X., 2001. Untangling the erbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 127-137.

Zhou B.B., Zhang H., Damelin M., Geles K.G., Grindley J.C., Dirks P.B., 2009. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 8(10), 806-823.

## 5.2 Artigo 2

### **Mammospheres: Differential expression of genes related at breast cancer molecular classification emerges as linked to cancer stem cells markers.**

Moreira, MP<sup>1</sup>, Cassali, GD<sup>2</sup>, Silva, LM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Celular, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Patologia Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

#### **ABSTRACT**

There is increasing evidence that breast cancer may be driven by a small subset of ‘tumor-initiating cells’ or ‘cancer stem cells’ (CSC’s) that display stem cell properties. These cells are responsible for sustaining tumorigenesis, tumor resistance to conventional cancer therapies and relapse. Cells with function characteristic of stem/progenitor cell can be isolated from breast cancer cell lines and propagated *in vitro* as mammospheres. Therefore, the present study aimed to characterize the parental cell lines BT-549 and Hs 578T according with the stem cell classification preconized by the International Society of Cellular Therapy through flow cytometry to the detection of subpopulations of stem cell (CD90, CD105, CD146, CD31, CD34, CD45, CD24) and analyze the expression of some genes related to molecular classification of breast cancer (*ERBB2*, *MKI67*, *KRT5*, *CDH3* and *TP63*) in mammospheres-derived from parental cell lines by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The immunophenotype showed that the cell line is comprised a subset of cells with characteristic of mesenchymal stem cell. We found cues of the participation of the genes analyzed in the formation of the mammospheres. There was a differential expression for all the genes analyzed when the mammosphere-derived from the parental breast cancer cell lines BT-549 cultured in Matrigel™. These findings offer a better knowledge of mammospheres features in 3D culture. Based in our results we believe that the cell line BT-549 is a better model to study stem/progenitor cell and we highlight the genes *ERBB2* and *TP63* as promising markers of CSC’s. This model can be used for study breast carcinogenesis, find new molecular markers and cancer drug screening.

Keywords: cancer stem cells, mammospheres, breast cancer, three-dimensional culture, gene expression.

## 1. Introduction

Tumors are formed by a variety of cells with functional heterogeneity characterized by distinct capacity of proliferation and differentiation [1]. Two models attempt to explain this heterogeneity, the clonal evolution and the cancer stem cell models. The first model postulate that any cell with proliferative capacity that undergoes mutation can be selected due growth advantage and become the dominant population of the tumor. The stem cell hypothesis proposes a hierarchical organization of cells within the tumor where only a small subpopulation of cells has the ability of proliferate and to form new tumors. These cells are known as cancer stem cells (CSC). The CSC model is based on the self-renewal capacity of tumors due to the presence of stem cells in these tissues [2, 3, 4]. Any proliferative cell could serve as CSC, if it acquires mutations that enabled them to undergo self-renewal and prevent the differentiation to a post-mitotic state [5].

Breast cancer is the most frequently cancer in women worldwide with an estimated 296,98 new cases in 2013 [6]. It is a heterogeneous disease with distinct subtypes each one associated with different clinical implications, evolution, therapeutic response and molecular profile [7, 8]. This diversity can be attributed, at least in part, to the existence of the cancer stem cells (CSC) [9]. In breast cancer a small subpopulation of cells  $CD44^+/CD24^{-low}/ALDH^+$  were identified in immunocompromised mice as the only responsible to form new tumors [10, 11]. These cells have also been implicated in metastasis process [12, 13, 14].

Stem cell and cancer stem cell has many features in common, like quiescence, self-renewal, resistance to apoptosis, increased activity of membrane transporters like ABC transporters, anchorage independence and ability to migrate. These characteristics make it inherently more resistant to conventional cancer therapies [15, 16]. Indeed, there is many evidence that the CSC are resistant to current cancer therapies (radiotherapy and chemotherapy) and responsible for tumor relapse [16-22].

A great advance in stem cell research was made by Reynolds and Weiss in 1992 [23] that developed an assay that allow culture neuronal cells with stem cell properties. Based on this model, mammary cells with function characteristic of stem/progenitor cell can now be prospectively isolated and propagated *in vitro* as non-adherent spheres, termed mammospheres. The mammospheres are able of self-renewal and to differentiate in the mammary epithelial lineages [15, 24].

Three-dimensional (3D) *in vitro* models are very important in the studies of normal and malignant development as well as for molecular studies in the search of new therapeutic targets and in the screening of new therapeutic drugs in cancer because they mimic the *in vivo* environment more precisely due to re-establishment of signals from the extracellular matrix [25-28]. Therefore studies on 3D models are extremely important because they can provide the appropriate structural and functional context for perform genetic and biochemical analysis [29, 30]. So the present work aim to evaluate the differences between mammospheres isolated of the parental breast cancer cell lines BT-549 and Hs 578T and their respectively 3D culture (Matrigel™) through optical characterization, immunophenotype ((CD90, CD105, CD146, CD31, CD34, CD45, CD24) ) and gene expression of important genes of the molecular classification of breast cancer (human epidermal growth factor receptor 2 (*ERBB2*), cytokeratin 5 (*KRT5*), antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (*MKI67*), P-Cadherin (*CDH3*) and tumor protein p63 (*TP63*)).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation and *in vitro* expansion of progenitor/stem cells

BT-549 (Cat. # HTB-122™) and Hs 578T (Cat. # HTB-126™) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and propagated according to the manufacturer's instructions. Mammosphere assay was made in low-attachment plates (Corning) using DMEM/F-12 medium with 20ng/mL of EGF, 10µg/mL of bovine insulin, 2% of horse serum and 0,5µg/mL of hydrocortisone [29], all obtained from Sigma, for seven days. The mammospheres were cultured in three-dimensional on-top system using Matrigel™ (BD Bioscience) according with Lee et al. [31] in

plate of 24 well. These cultures were maintained for 3 days. All cultures were incubated in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

## 2.2. Fluorescence optical microscopy

Fluorescence: The mammospheres were labeled with Image-iT™ LIVE Plasma Membrane and Nuclear Labeling kit (Invitrogen), Phalloidin Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes) and the nuclei were counterstained with 4,6-diaminidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions. Image acquisition was performed using AxioVert 200 microscope (Zeiss). For 3D culture the cells were stained directly in the Matrigel™ doubling the incubation time.

Immunofluorescence: The mammospheres were fixed with formaldehyde 4% for 1h at room temperature and washed 3 times with PBS 1X. Cells were pre-incubated in blocking solution (10% fetal bovine serum, 1% bovine serum albumin) and then stained with anti- $\alpha$ -Tubulin (Zymed), anti-E-Cadherin (BD Biosciences) and anti-CD144 (VE-Cadherin) Alexa Fluor® 488 (eBioscience) at room temperature for 45 min. After incubation, cells were washed 3 times and incubated with secondary antibody anti-mouse IgG (Fab specific) - FITC (Sigma) for 30 min, except for anti-VE-Cadherin. The nuclei were counterstained with DAPI. The cells labeled with anti- $\alpha$ -Tubulin were previously permeabilized with 0,1% Triton X-100 (PlusOne). Image acquisition was performed using AxioVert 200 microscope (Zeiss). For 3D culture the cells were stained directly in the Matrigel™ doubling the incubation time.

## 2.3. Flow cytometry analysis

BT-549 and Hs 578T cell lines were washed with PBS 1X and resuspended in wash buffer (PBS 1X, 0,1% sodium azide and 1% fetal bovine serum) ( $1,0 \times 10^6$  cells/100 $\mu$ L). The cells were incubated with the antibodies anti-human CD31 (V450), CD34 (APC), CD45 (AmCyan), CD90 (PE-Cy™7), CD105 (PerCP-Cy™5.5), CD146 (PE), obtained from BD Biosciences and CD24 (FITC; Invitrogen) and their respective isotype controls at the concentration recommended by the manufacturer. The antibodies were incubated protected from light for 30 min at room temperature.

Then the cells were washed with wash buffer and resuspended in 0,5mL of the same buffer. The data acquisition was made on FACSCanto II (BD Bioscience) using the *software* FACSDiva 6.1.3.

#### 2.4. RNA isolation and Quantitative PCR analysis

Total RNA was isolated from the mammospheres using TRIzol® (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Colonies were isolated from 3D culture by enzymatic digestion with 0,46 mL/well of Dispase 10 mg/mL (Gibco) for 1h/37°C followed by homogenization with TRIzol®. The concentration of total RNA and the absorbance 260/280 were measured using the equipment NanoVue (GE Healthcare). Total RNA were treated with RNase-free DNase Set (Qiagen). cDNA was synthesized using 1,0 µg of total RNA with M-MLV Reverse transcriptase (Promega). The qRT-PCR (quantitative real-time PCR) was performed with Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) according with manufacture instructions using a Stratagene Mx3005P detection system (Agilent Technologies). Two negative controls (with no cDNA and with no transcriptase reverse) were prepared for every set of reactions. The primers sequences used in this study are human epidermal growth factor receptor 2 (*ERBB2*) (GenBank NM\_004448; PrimerBank 4758298a3), keratin 5 (*KRT5*) (GenBank NM\_000424; PrimerBank 119395753b3), antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (*MKI67*) (GenBank X65551; PrimerBank 415821a3), P-Cadherin (*CDH3*) (GenBank NM\_001793; PrimerBank 14589891a1) and tumor protein p63 (*TP63*) (GenBank AJ315499; PrimerBank 169234656c1). The concentrations of primers optimized for use were 200nM FW/150nM RV (*ERBB2*), 250nM FW/150nM RV (*KRT5* and *TP63*), 250nM FW/250nM RV (*MKI67* and *CDH3*). The PCR cycling conditions were performed as follows: 95 °C for 10 min and 40 cycles of 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 60 s and extension at 72 °C for 30 s. The values obtained were normalized using the housekeeping gene TATA box binding protein (TBP) (GenBank NM\_003194; Li et al. [32]) and relative expression level were calculated with the  $\Delta\Delta C_t$  method [33] using as calibrator the parental cell lines or the mammospheres-derived.

## 2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using REST 2009 software (Qiagen) to measure the differences between the groups in the two types of culture. A p value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

## 3. Results

### 3.1 Cell line morphology

The mammospheres-derived obtained from the parental cell lines BT-549 and Hs 578T, cultivated for seven days under non-differentiating culture condition, showed different sizes and shapes (rounded and elongated). The mammosphere-derived Hs 578T in comparison with the BT-549 is bigger, better delineated and dense (the visualization of the cells that form the mammospheres is much more difficult than the mammosphere-derived BT-549) (Figure 1A). The markers Phalloidin/DAPI and Image iT™ were used to visualize the mammospheres-derived morphology. They have a diffuse distribution actin filaments and the nuclei are difficult to visualize especially for mammosphere-derived Hs 578T (Figure 1B). The analysis of important molecules involved in the organization and cellular adhesion showed that mammospheres-derived from BT-549 and Hs 578T presented  $\alpha$ -tubulin and absence of E-cadherin, VE-cadherin (Figure 1C), showing a low adhesion between the epithelial cells that form the mammospheres. The parental cell lines also do not express the adhesion molecules (E-cadherin, VE-cadherin) and express  $\alpha$ -tubulin (data not show). The absence of adhesion molecules is consistent with tumoral cells features allowing excessive proliferation.

The whole mammospheres, after seven day of culture in undifferentiating culture condition, were plated in Matrigel™ for three days. The mammospheres attach to the Matrigel™ and it was possible to visualize cells migration from the mammospheres with an invasive aspect (Figure 2A). The Matrigel™ is effective for cell growth and differentiation and so these cells could be in a differentiation process. The morphology can also be visualized through the stained with Phalloidin/DAPI and Image iT™. The mammospheres present a higher expression of actin



filaments than the cells in migration. In 3D culture the expression of  $\alpha$ -tubulin, E-cadherin, VE-cadherin remains the same as mammosphere-derived (Figure 2C).

---

Figure 1 - Mammospheres-derived from BT-549 and Hs 578T cell lines. I) Mammospheres-derived culture showing the day 1 (A, H) to day 7 (G, N), respectively for BT-549 and Hs 578T. Mammosphere-derived Hs 578T are observed since the day 1 (asterisk) and during the period of culture there were a decrease in the number of mammospheres. II) The mammospheres-derived were stained with Phalloidin/DAPI (green/blue) and Image iT™ (red/blue) at day 7. The differential interference contrast (DIC) images are represented in A, C for BT-549 and E, G for Hs 578T. The mammospheres-derived have a homogeneous distribution of actin filaments. III) Mammosphere-derived labeled with  $\alpha$ -tubulin, E-cadherin, VE-cadherin. It can be visualize  $\alpha$ -tubulin in the periphery of the mammospheres (arrow) and absence of E-, VE-cadherin for both cells.

Figure 2 - Mammospheres BT-549 and Hs 578T cultured in Matrigel™ for three days. I) It is possible to visualize cells migration from the mammospheres since the day 1 (arrow). II) In the third day of culture the cells were labeled with Phalloidin/DAPI (green/blue) and Image iT™ (red/blue). The differential interference contrast (DIC) images are represented in A, C for BT-549 and E, G for Hs 578T. III) Mammosphere labeled with  $\alpha$ -tubulin (B, H), E-cadherin (D, J), VE-cadherin (F, L). It can be visualized  $\alpha$ -tubulin marker and absence of E-cadherin, VE-cadherin for both cells.

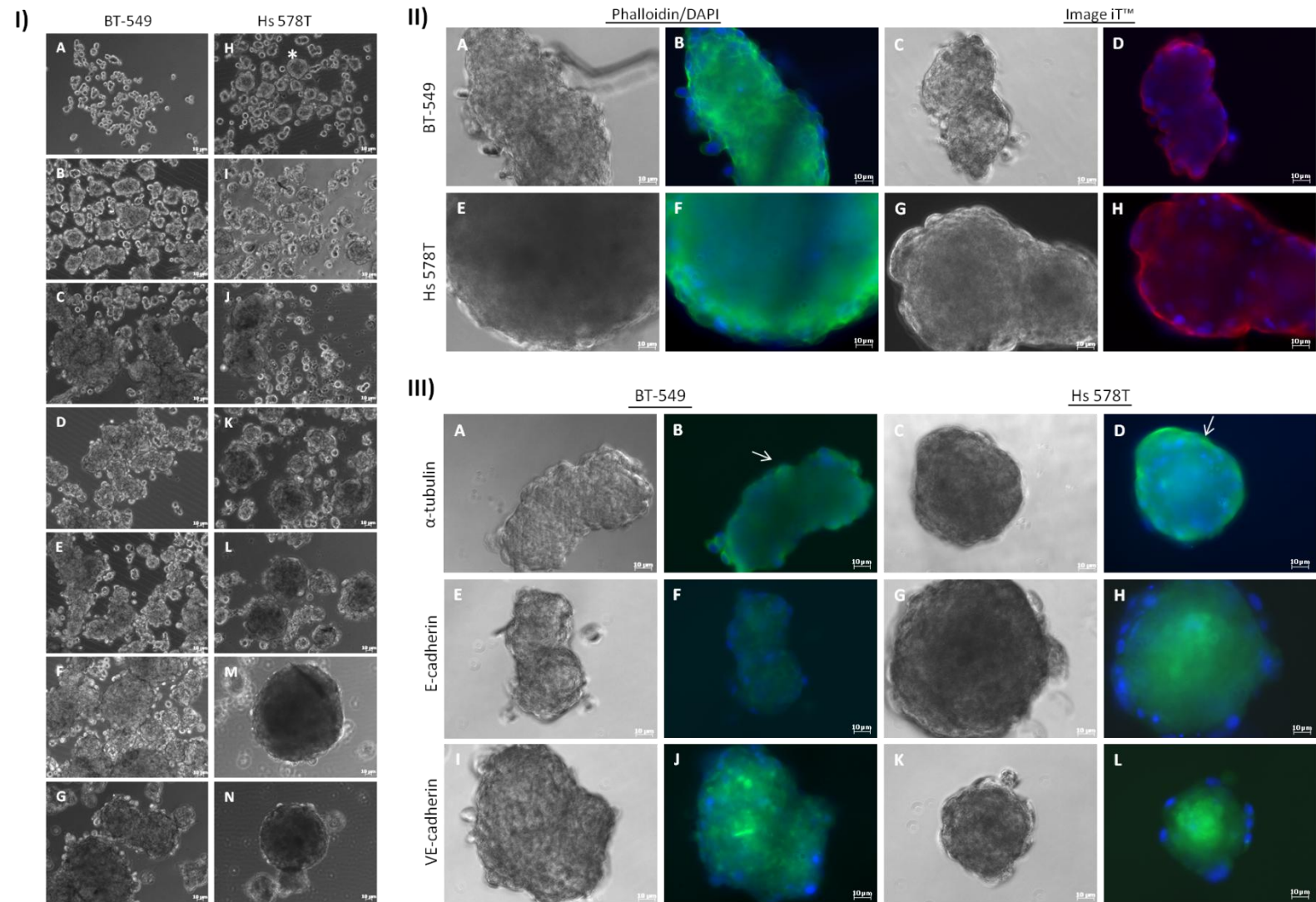


Figure 1 (Legend on previous page)

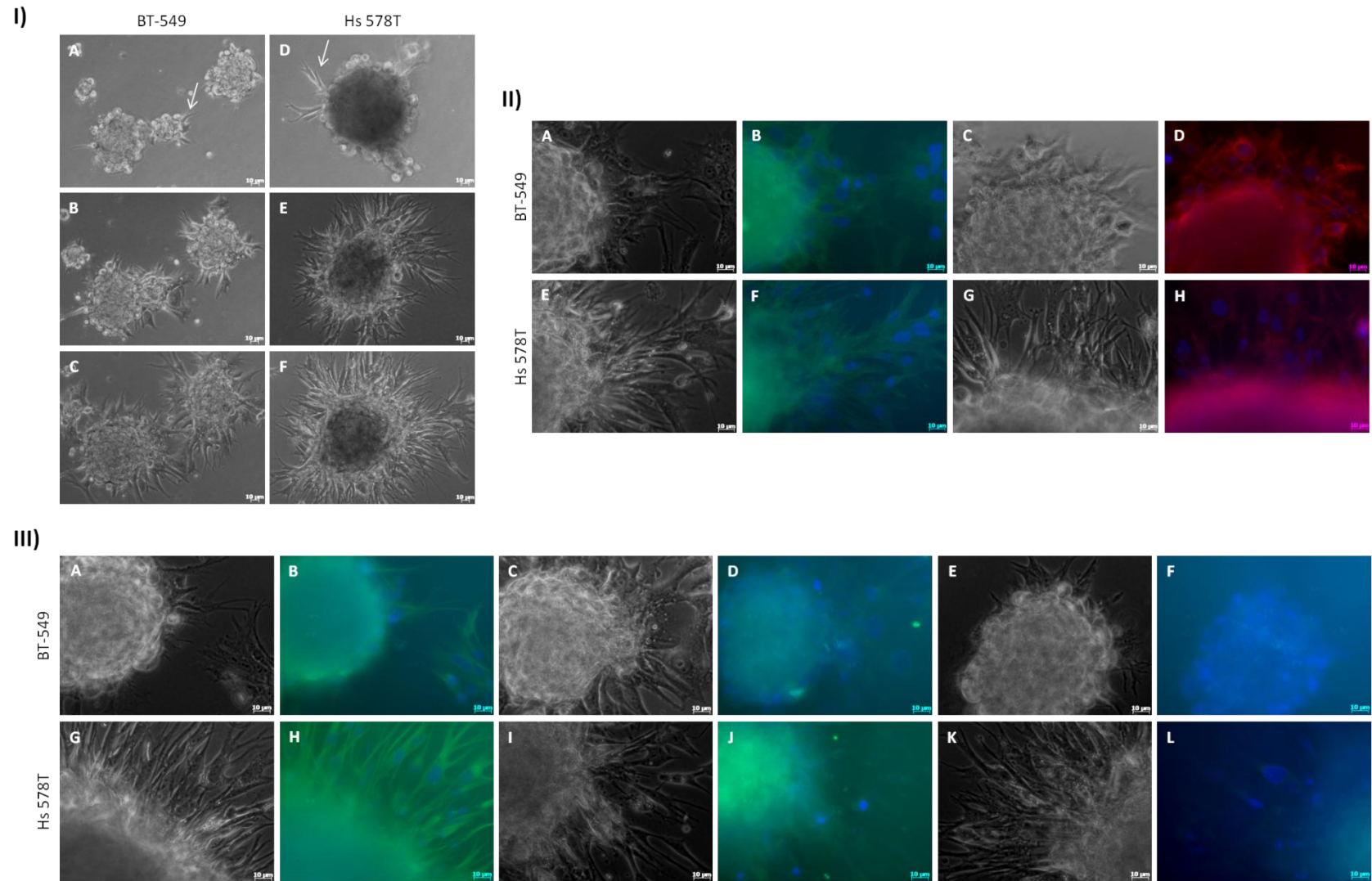


Figure 2 (Legend on previous page)

### 3.2 Flow cytometric analysis

The analysis by flow cytometry of BT-549 and Hs 578T cell lines cultured in monolayer showed that both cells express CD90, CD146, CD105 markers and showed no expression of CD34, CD31 e CD45. The BT-549 also showed expression of the marker CD24 in contrast of the Hs 578T cell line, making this the main marker to differentiate the two cell lines (Figure 3). The CD146 is more expressed in BT-549 compared to Hs 578T and the CD105 is more expressed in the Hs 578T.

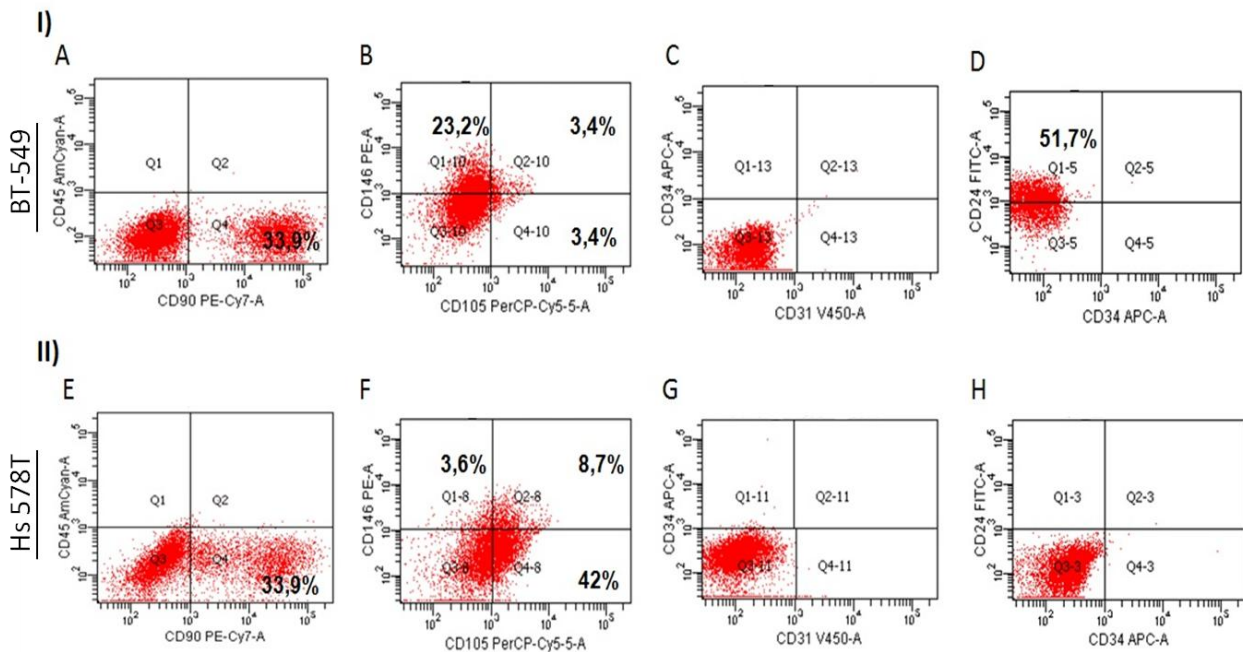


Figure 3 – Immunophenotype of BT-549 and Hs 578T cell lines according to mesenchymal stem cell classification and CSC markers. I) BT-549 (A a D): presents subpopulations expressing CD90, CD146, CD105 e CD24 and small subpopulations with double expression of CD146/CD105. No expression of CD34, CD31 e CD45 is observed. II) Hs 578T (E a H): presents subpopulations expressing CD90, CD146, CD105 and small subpopulations with double expression of CD146/CD105. No expression of CD34, CD31, CD45 e CD24. The numbers indicated represent the percentage of labeled cells.

In summary we classify the parental cell line BT-549 as  $CD90^+/CD146^+/CD105^+/CD31^-/CD34^-/CD45^-/CD24^+$  and the Hs 578T as  $CD90^+/CD146^+/CD105^+/CD31^-/CD34^-/CD45^-/CD24^-$  (Figure 3).

### 3.3 Gene expression analysis

The analysis of the molecular breast cancer markers (*ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* and *TP63*) shows a differential expression in the mammospheres-derived BT-549 and Hs 578T compared with the respectively parental cell lines. For mammosphere-derived BT-549, the gene *KRT5* were up-regulated (4.83-fold;  $p = 0.000$ ) and the others genes showed a increased in their expression (*ERBB2* 1.2-fold,  $p = 1.000$ ; *MKI67* 0.24-fold,  $p = 0.491$ ; *CDH3* 1.63-fold,  $p = 0.491$ ). The gene *TP63* showed the same expression in the two types of culture ( $p = 0.509$ ) (Figure 4). For mammosphere-derived Hs 578T the genes *ERBB2*, *MKI67*, *CDH3* and *TP63* were down-regulated (-2.19-fold; -4.64-fold; -6.28-fold; -2.65-fold, respectively) with a  $p$  value of 0.000 for all genes and the gene *KRT5* show a small increase in their expression (0.19-fold,  $p = 0.491$ ) (Figure 4). The expression data indicates that the genes analyzed may be markers for stem/progenitor cell since we demonstrated differences in their expression between the differentiated parental cell lines with their respectively undifferentiated mammosphere-derived.

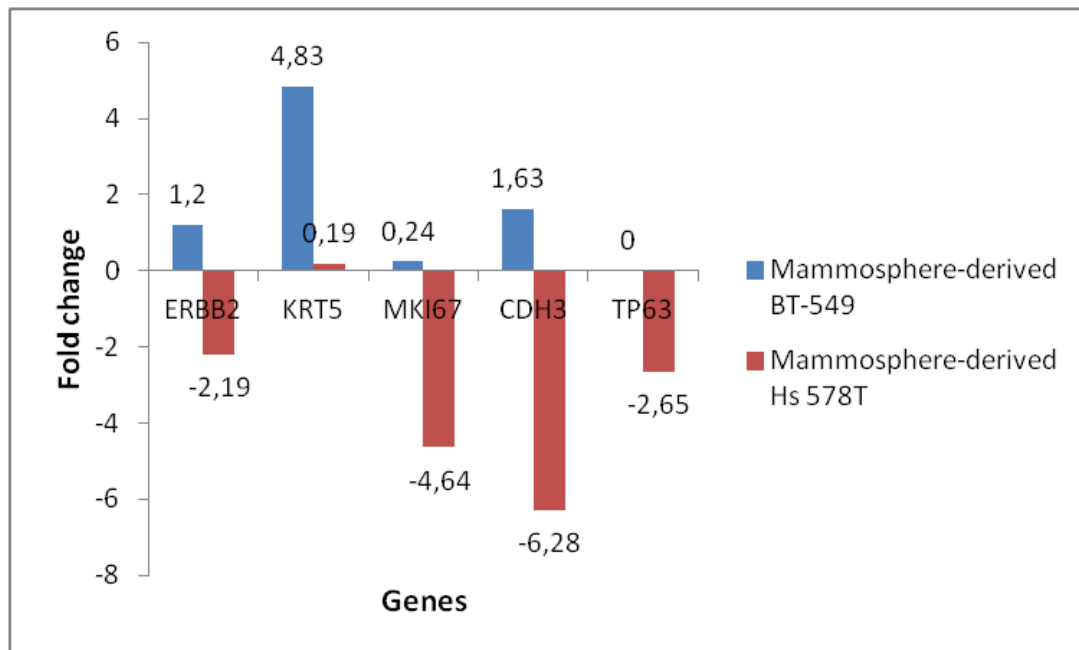


Figure 4 - Relative gene expression levels of the genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* and *TP63* in the mammospheres-derived BT-549 and Hs 578T compared with the respectively parental cell lines grow in monolayer (2D). These data show a differential expression between the two types of culture.

We also found a differential expression of these genes when we compared the mammospheres cultured in Matrigel™ with the mammospheres-derived. For mammosphere BT-549 (3D) the genes *ERBB2* (-2.78-fold;  $p = 0.000$ ), *CDH3* (-0.61-fold;  $p = 0.000$ ) were down-regulate, the gene *KRT5* showed a decrease in their expression (-0.31-fold;  $p = 0.491$ ) and the gene *MKI67* were up-regulated (0.49-fold;  $p = 0.000$ ) (Figure 5). The mammosphere Hs 578T (3D) showed that the gene *MKI67* was up-regulated (4.94-fold;  $p = 0.000$ ) (Figure 5). Unfortunately the genes *ERBB2*, *KRT5* and *CDH3* showed no amplification in the 3D culture for Hs 578T and the gene *TP63* showed no amplification in the mammospheres 3D for both cell lines. We believe that the gene expression found probably correspond more faithfully with the gene expression of the cells, once the reestablishment of cell-matrix interaction mimics the tissue phenotype *in vitro*

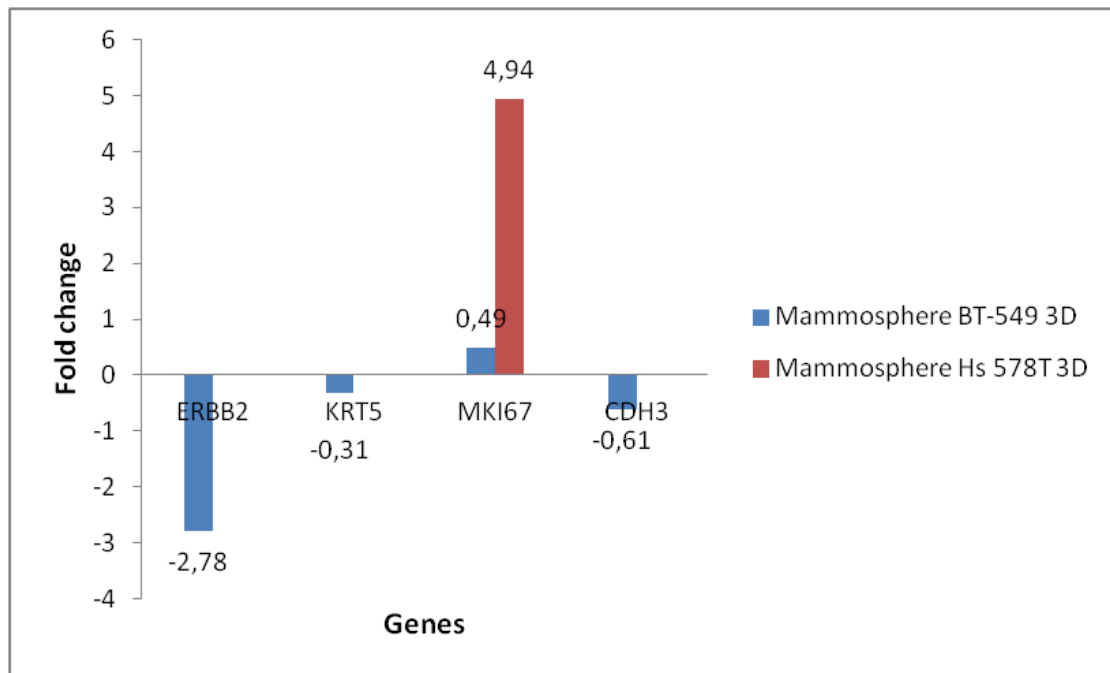


Figure 5 - Relative gene expression levels of the genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67* and *CDH3* in the mammosphere BT-549 and Hs 578T cultured in 3D. These data show a differential expression when both mammospheres were cultured in Matrigel™ compared with the mammosphere-derived. For the mammosphere Hs 578T in 3D culture there is no amplification data for the genes *ERBB2*, *KRT5* and *CDH3* and the gene *TP63* showed no amplification for both cell lines

#### 4. Discussion

Breast cancer is the second leading cause of cancer death among women worldwide, exceeded only by lung cancer, with an estimated 39,620 breast cancer deaths in 2013 [6], probably because it is generally diagnosed at an advanced stage [35]. There is increasing evidence that a wide

variety of malignancies, including breast cancer, may be driven by a small subset of 'tumor-initiating cells' or 'cancer stem cells' (CSCs) that display stem cell properties [36]. The cancer stem cell theory states that these cells are responsible for tumor initiation, progression, resistance to current therapies and recurrence [3].

The mammosphere assay has been widely used in stem cell research field. The standard protocol to obtain these spheres is based in serum-free conditions. We tested different culture medium with different supplements, like epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), bovine insulin, bovine albumin, hydrocortisone, fetal bovine serum and horse serum (data not show). In fact the presence of fetal bovine serum does not provide mammosphere formation, but the use of horse serum proved to be useful in ours experiments. The culture medium used in our study were originally described by Debnath et al. [29] to culture acini-like spheroids from mammary epithelial cell line (MCF-10A) in three-dimensional culture. We demonstrate that this medium can also be used in non-adherent mammosphere assay.

We showed through morphological analysis that the BT-549 and Hs 578T parental cell lines in an undifferentiated condition were capable of form mammospheres. There are slight differences between the mammospheres-derived of the two cell lines regarding the shape and size (Figure 1). The mammosphere-derived Hs 578T are much more dense and difficult to dissociate by enzymatic digestion that the mammosphere-derived BT-549. And so we speculate that the mammosphere-derived Hs 578T may secrete and deposit proteins of the ECM in more abundance than the BT-549. According with Dontu et al. [24] mammospheres are capable of express extracellular matrix (ECM) components. They believe that although the mammospheres are capable of survive in the absence of a substratum of anchorage, other cells presents in the mammospheres may depend on the presence of ECM components to survive.

The expression of  $\alpha$ -tubulin showed structural and morphology integrity of the mammospheres, since this is an important constituent of the microtubule cytoskeleton, responsible for development

and maintenance of cell morphology, the transport of vesicles, of mitochondria and other components through the cells, cell signaling, cell division and mitotic [37, 38]. The absence of E-cadherin observed in the mammospheres is consistent with the epithelial–mesenchymal transition (EMT) that is associated with a cancer stem cell phenotype [39]. This process consists of loss of epithelial adhesion molecule E-cadherin resulting in acquisition of mesenchymal phenotype with increase of cell motility and invasiveness [40]. The CSC was related to the appearance of metastasis and EMT is crucial for this process.

Analysis by flow cytometry classified the parental cell line BT-549 as CD90<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> and the Hs 578T as CD90<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup>. The profile CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> is used by the International Society of Cellular Therapy [34] to characterize the mesenchymal stem cell for use in cell therapy. The CD90 is a marker of CSC of liver, murine breast mammary cells and glioma [42-43]. The CD146 was correlated with cellular motility, invasion and tumor progression [44, 45] and also with the cells CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> [44] in breast cancer cell lines. CD146 was more expressed in BT-549 than in the Hs 578T, which may be related to the origin of these cell lines, since the BT-549 was isolated from an invasive metastatic tumor. The CD105 is present in mesenchymal stem cells [34]. The higher expression of CD105 in Hs 578T may be related to the fact that this is a carcinosarcoma, comprised of epithelial and myoepithelial cell. Taylor-Papadimitriou et al. [46] associated the myoepithelial cell compartment as being the same of the progenitor/stem cells niche of the breast. The CD24 is a marker of many tumor cells, like breast [47], ovary [48], lung [49] and prostate [50]. This molecule can increase cell proliferation and is involved in metastasis process [51, 52], which explain the expression observed in BT-549, and was also identified as a marker of CSC of breast (CD24<sup>-low</sup>/CD44<sup>+</sup>) [10].

The mammospheres has the ability to self-renew [15, 24] what we confirmed through the dissociation of mammospheres BT-549. When the mammospheres were dissociated by us, the isolated cells were capable of form new mammospheres. Dontu, Al-Hajj et al. [15] and Dontu et al.



[24] also showed that the mammospheres are capable to form complex functional structures in 3D culture. When we cultured the parental cell line BT-549 in Matrigel™ with the medium that favors mammospheres-derived we observed the formation of three-dimensional structures (data not show) starting in the first culture day. With this in mind, we wanted to know what would happening if we cultivated the mammospheres in Matrigel™ with this medium. We observed in 3D culture that the mammospheres attach to the substrate (Matrigel™) and the cells starts migration process, perhaps undergoing differentiation (Figure 2) but they were not able to form three-dimensional structures like observed in parental cell line. One possible explanation for the differences observed in the 3D culture of the parental cell line and their mammosphere-derived using the same medium is that the cell line is comprised of several cells subset as evidenced by immunophenotype (Figure 3) and the mammospheres of undifferentiated cells that do not have a cell fate determinated.

Our expression data for the gene *ERBB2* showed that this gene was expressed in the parental cell lines analyzed (BT-549 and Hs 578T) although others authors [53, 54] showed the opposite. All our primers had they authenticity certified by the Primer-BLAST tool ensuring that they are able to specifically recognize the target gene, guarantying the reliability of our data.

The gene *ERBB2* (Human epidermal growth factor receptor 2) is a proto-oncogene involved in cell growth, differentiation, apoptosis and metastasis [55]. The up-regulation of the protein HER-2 is found in approximately 18-20% of the mammary carcinomas [56, 57], increasing the aggressiveness of the tumor [57, 58]. Breast cancer patients with tumors that overexpress *ERBB2* could have an increase in their survival when treated with monoclonal antibody anti-HER2 or Trastuzumab (Herceptin®) [59]. However, a large number of patients with HER2-overexpressing do not respond to trastuzumab therapy, and those who do respond may develop resistance to the treatment [60, 61].

Our result showed that the gene *ERBB2* showed an increase in their expression in mammosphere-derived BT-549 ( $p = 1.000$ ) and was down-regulated in mammosphere-derived Hs 578T ( $p =$

0.000) in comparison with the respectively parental cell lines in monolayer. Korkaya et al. [36] correlated the overexpression of *ERBB2* with increase in stem/progenitor cell population in non-malignant and malignant mammary cells driving tumorigenesis, invasion, and metastasis. The mammosphere-derived Hs 578T stopped growing after seven days, as observed by the decrease in number mammospheres (Figure 2), in accordance with the down-regulation of the gene *MKI67* ( $p = 0.000$ ) (proliferation marker), different from the observed in the mammosphere-derived BT-549, that showed a increased expression ( $p = 0.491$ ) (Figure 4). Probably, the mammospheres-derived BT-549 that overexpress *ERBB2* present a majority of cancer stem cells pools as well as the invasiveness capacity as indicated by  $CD24^+$  subset (Figure 3). For mammosphere BT-549 in 3D culture there was a down-regulation of the genes *ERBB2* ( $p = 0.000$ ) and *CDH3* ( $p = 0.000$ ) and a decrease of expression of the gene *KRT5* ( $p = 0.491$ ). The gene *MKI67* was up-regulated which is correlated with proliferation of cells observed from the mammospheres. The up-regulation of *MKI67* ( $p = 0.000$ ) was also observed in mammosphere Hs 578T 3D which could be associated with the proliferation (Figure 5). Magnifico et al. [62] also demonstrate that mammospheres have a higher expression of *ERBB2* compared with their parental cell line and the mammosphere culture in Matrigel™, which correlated with ours finds for BT-549.

The gene *KRT5* encodes a cytokeratin, which belong to intermediate filament of cytoskeleton important in the mechanic stability and integrity of epithelial cells [63]. The gene *CDH3* encodes an adhesion protein (P-cadherin) which binds more weakly to the actin filaments of cytoskeleton as compared to E-cadherin provided a less stable adhesion between cells favoring cell proliferation [64] and has been associated with invasive capacity of tumor cells [65]. These genes have been associated with breast stem cell marker *CD44* [66] and *ALDH1* [11] and so they can be considered a markers of stem/progenitor cells. This is in agreement with our finds that showed a increased of the expression of the gene *CDH3* ( $p = 0.491$ ) and a up-regulation of *KRT5* ( $p = 0.000$ ) in the mammosphere-derived BT-549 compared with the parental cell line (Figure 4). We also observed a small decrease in *KRT5* expression ( $p = 0.491$ ) and a down-regulation of the gene *CDH3* ( $p = 0.000$ ) in the mammosphere BT-549 cultured in 3D compared with mammosphere-derived (Figure

5), perhaps the mammospheres in the Matrigel™ are in a differentiation process. For mammosphere Hs 578T these genes showed no amplification in 3D culture.

The gene *TP63* is a member of the tumor suppressor gene p53 family highly expressed in the basal layer of epithelial tissues, involved in the maintenance of stem/progenitor cell populations thereby contributing to the development of the tissues [67, 68]. Du et al. [69] showed that breast cancer cell line MCF7 overexpressing *TP63* increased the CSC population (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) and that these cells were drug resistance. So this gene has a potential value as a predictor of cell chemoresistance [70]. *TP63* has a great importance in regulating a number of pathways involved in normal development and carcinogenesis, such as cell cycle, cell death, cell proliferation and adhesion molecules [71]. It also is involved in important pathways involved in self-renewal of stem cells, such as Wnt, Sonic hedgehog (Shh) and Notch. These pathways are also involved in the process of tumorigenesis, therefore it can be a potential marker of CSC [72, 73].

We did not found differences in the expression of gene *TP63* between the mammospheres-derived BT-549 compared with their parental cell line ( $p = 0.509$ ) (Figure 4), showing that is possibly that the population of stem/progenitor cell remains constant between the two form of culture. For the mammosphere-derived Hs 578T the gene *TP63* was down-regulated compared with the parental cell line ( $p = 0.000$ ) (Figure 5). This could mean a reduction in the population of stem/progenitor cell of the mammosphere-derived Hs 578T possibly implying in the reduction in the number of mammospheres observed during the seven days of culture (Figure 1). In fact, Senoo et al. [74] demonstrated the importance of p63 in renewing the population of stem cells. Perhaps the no amplification observed of *TP63* in the mammosphere for both cell lines in 3D culture could be related to a possible differentiation process in these cells (Figure 5). Yang et al. [67, 68] believe that the expression of *TP63* decrease during differentiation process. However the loss of expression of this gene must be confirmed by immunohistochemistry analyses.

In summary, the expression profile of the mammosphere-derived BT-549 and Hs 578T for the

genes *ERBB2* and *TP63* may be influencing profoundly in the maintenance/proliferation of these cells. The mammosphere-derived BT-549 showed an increased expression of *ERBB2* and the expression of *TP63* remains at basal level, in contrast with the mammosphere-derived Hs 578T that showed a down-regulation of these genes. This indicates the great importance of these genes in the regulation of stem/progenitor cells.

Although we did not characterize the CSC (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup>/ALDH) the expression data found probably correspond to these cells, once they were isolated from tumor cell lines. The expression of genes of the breast cancer molecular classification found provided cues of the participation of these genes in the formation of the mammospheres-derived, highlighting the genes *ERBB2* and *TP63* that are strongly associated with stem cell population. Considering our experimental design the cell line BT-549 proved to be better than the Hs 578T to perform mammosphere assay.

In 3D system we found a differential expression profile of mammospheres, in this case, there are a decrease of the all genes, except the *MKI67* for mammosphere BT-549. The suppression of commonly related genes associated with stem cell indicates the Matrigel role in the differentiation process. The reestablishment of the interaction cell-matrix extracellular provided by Matrigel™ is being used to study normal development and tumorigenesis. Candidate marker of CSC could be identified by comparing the gene expression profile of the mammospheres isolated from breast cancer cell line with the mammospheres in Matrigel™. This could bring great advance in the study of CSC because the stem/progenitor cell will be in an environment that mimics the *in vivo* [25]. *In vitro* assays are reliable, reproducible and low-cost experiments in the attempt to standardize methods and define clinical experimental models.

## References

1. Heppner GH, Miller BE. Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev.* 1983;2(1):5-23.
2. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105-111.

3. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*. 2007;6(19):2332-2338.
4. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(10):755-68.
5. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011;469(7330):314-22.
6. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2013*. Atlanta: American Cancer Society. 2013.
7. Perou CM et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752.
8. Sørlie T et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-10874.
9. Rappa G, Loricco A. Phenotypic characterization of mammosphere-forming cells from the human MA-11 breast carcinoma cell line. *Exp Cell Res*. 2010;316(9):1576-86.
10. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-8.
11. Ginestier C et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007 Nov;1(5):555-67.
12. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):1154-9.
13. Schindelmann S, Windisch J, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H. Expression profiling of mammary carcinoma cell lines: correlation of in vitro invasiveness with expression of CD24. *Tumour Biol*. 2002;23:139-145.
14. Charafe-Jauffret E et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res*. 2009;69(4):1302-1313.
15. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 2003;36 Suppl 1:59-72.
16. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):275-284.
17. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24<sup>(-low)</sup>/CD44<sup>+</sup> breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(24):1777-1785.
18. Li X et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(9):672-679.
19. Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(10):806-823.
20. Lee HE et al. An increase in cancer stem cell population after primary culture systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer*. 2011;104(11):1730-1738.
21. Dylla SJ et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following

chemotherapy. PLoS One. 2008;3(6):e2428.

22. Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. PLoS One. 2008;3(8):e3077.
23. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous culture. Science. 1992;255(5052):1707-1710.
24. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes Dev. 2003;17(10):1253-1270.
25. Weigelt B, Bissell MJ. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. Semin Cancer Biol. 2008;18(5):311–321.
26. Kenny PA et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. Mol Oncol. 2007;1(1):84–96.
27. Weaver VM, Lelièvre S, Lakins JN, Chrenek MA, Jones JC, Giancotti F, Werb Z, Bissell MJ. beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. Cancer Cell. 2002;2(3):205-216.
28. Weigelt B, Lo AT, Park CC, Gray JW, Bissell MJ. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. Breast Cancer Res Treat. 2010;122(1):35-43.
29. Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. Methods. 2003; 30(3): 256-268.
30. Jacks T, Weinberg RA. Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. Cell. 2002;111(7):923-5.
31. Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. Nat Methods. 2007;4(4):359–365.
32. Li YL, Ye F, Hu Y, Lu WG, Xie X. Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. Anal Biochem. 2009;394:397.
33. Livak, KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. Methods. 2001;25:402-408.
34. Dominici M et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8:315-317.
35. World Health Organization (WHO). Global status report on noncommunicable diseases. 2010.
36. Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. Oncogene. 2008 Oct 16;27(47):6120-6230.
37. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. Nature Reviews Cancer. 2004; 4(4): 253-265.

38. Pasquier E, Kavallaris M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life*. 2008; 60(3): 165–170.
39. Mani SA et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-715.
40. Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for therapy? *J Pathol*. 2011;223(2):147-161.
41. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90<sup>+</sup> cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(2):153-166.
42. Cho RW, Wang X, Diehn M, Shedden K, Chen GY, Sherlock G, Gurney A, Lewicki J, Clarke MF. Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors. *Stem Cells*. 2008;26(2):364-371.
43. He J, Liu Y, Zhu T, Zhu J, Dimeco F, Vescovi AL, Heth JA, Muraszko KM, Fan X, Lubman DM. CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(6):M111.010744.
44. Zabouo G, Imbert AM, Jacquemier J, Finetti P, Moreau T, Esterni B, Birnbaum D, Bertucci F, Chabannon C. CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. 2009;11(1):R1.
45. Zeng Q, Li W, Lu D, Wu Z, Duan H, Luo Y, Feng J, Yang D, Fu L, Yan X. CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(4):1127-1132.
46. Taylor-Papadimitriou J, Stampfer M, Bartek J, Lewis A, Boshell M, Lane EB, Leigh IM. Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *Journal of Cell Science*. 1989;94:403-413.
47. Fogel M, Friederichs J, Zeller Y, Husar M, Smirnov A, Roitman L, Altevoigt P, Sthoeger ZM. CD24 is a marker for human breast carcinoma. *Cancer Lett*. 1999;143(1):87-94.
48. Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *Am J Pathol*. 2002;161(4):1215-1221.
49. Kristiansen G, Schlüns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2003;88(2):231-236.
50. Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, Stürzebecher B, Stephan C, Jung K, Loening S, Rosenthal A, Dietel M. CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *Prostate*. 2004;58(2):183-192.
51. Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, Yagita H, Sleeman JP. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res*. 2005;65(23):10783-10793.
52. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 10;26(17):2813-2820.

53. Neve RM et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006;10(6):515–527.
54. Kao J et al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One*. 2009;4(7):1-16.
55. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the erbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2: 127-137.
56. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2 / neu oncogene. *Science*. 1987;235:177–182.
57. Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1652-1654.
58. Wolff A.C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):118-145.
59. Slamon D.J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med*. 2001;344:783-792.
60. Lan KH, Lu CH, Yu D. Mechanisms of trastuzumab resistance and their clinical implications. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1059:70-5.
61. Wilken JA, Maihle NJ. Primary trastuzumab resistance: new tricks for an old drug. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1210:53-65.
62. Magnifico A, Albano L, Campaner S, Delia D, Castiglioni F, Gasparini P, Sozzi G, Fontanella E, Menard S, Tagliabue E. Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clin Cancer Res*. 2009;15(6):2010-2021.
63. Moll et al 2008 Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008;129(6):705-33.
64. Wu JC, Gregory CW, DePhilip RM. P-cadherin and E-cadherin are co-expressed in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;195(3):1329-1335.
65. Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jerónimo C, Milanezi F, Schmitt FC.. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res*. 2005;11: 5869-5877.
66. Vieira AF et al. P-cadherin is coexpressed with CD44 and CD49f and mediates stem cell properties in basal-like breast cancer. *Stem Cells*. 2012;30(5):854-864.
67. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, deathinducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 1998;2(3):305-16.
68. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999; 398: 714–718.

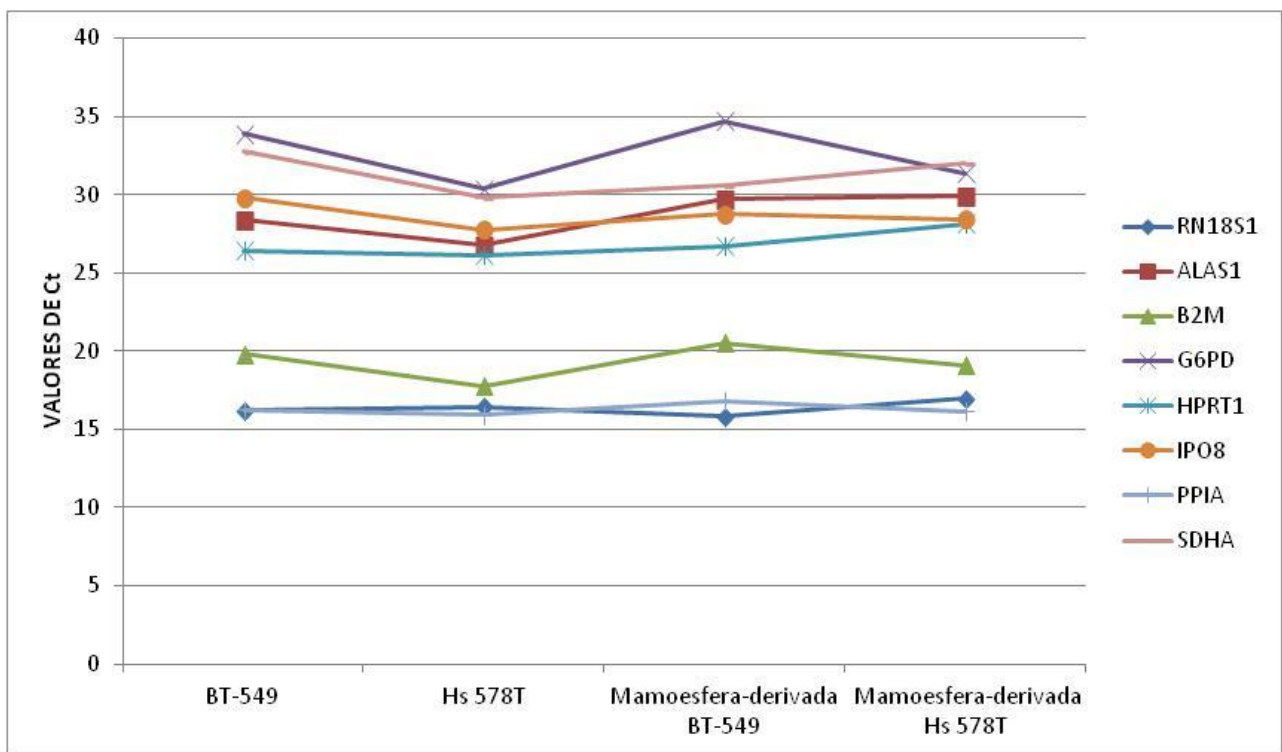


69. Du Z, Li J, Wang L, Bian C, Wang Q, Liao L, Dou X, Bian X, Zhao RC. Overexpression of  $\Delta Np63\alpha$  induces a stem cell phenotype in MCF7 breast carcinoma cell line through the Notch pathway. *Cancer Sci.* 2010;101(11):2417-24.
70. Lu C, Lu S, Liang W, Li J, Dou X, Bian C, Shi D, Liao L, Zhao RC. Tap63 $\alpha$  mediates chemotherapeutic agent-induced apoptosis in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011;20(8):1319-1326.
71. Yang A, Zhu Z, Kapranov P, McKeon F, Church GM, Gingeras TR, Struhl K. Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells. *Mol Cell.* 2006;24(4):593-602.
72. Taipale J, Beachy AB. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature.* 2001;411(6835):349-54.
73. Nekulova M, Holcakova J, Coates P, Vojtesek B. The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2011;16(2):296-327
74. Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F. p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell.* 2007;129(3):523-536.

## 6. RESULTADOS ADICIONAIS

### 6.1 Análise de genes de referência

Foi avaliada a expressão de genes referência (Housekeeping genes) que são genes constitutivos transcritos a nível constante para determinar se existe diferença na expressão desses genes entre as linhagens celulares parentais e suas respectivas mamoesferas-derivadas. Para isso nós utilizamos *RealTime ready Human Reference Gene Panel* assay (Roche, cat. # 05339545001), que permite analisar 19 genes de referência simultaneamente. Nós obtivemos amplificação de 8 genes para todas as amostras analisadas. Na figura 9 é possível observar o perfil de expressão de cada gene entre as amostras estudadas. A estabilidade da expressão desses genes foi avaliada no programa *GeNorm*, e os genes mais estáveis estão descritos na Tabela 5 e na Figura 11 pode-se visualizar o gráfico da média da estabilidade de expressão.

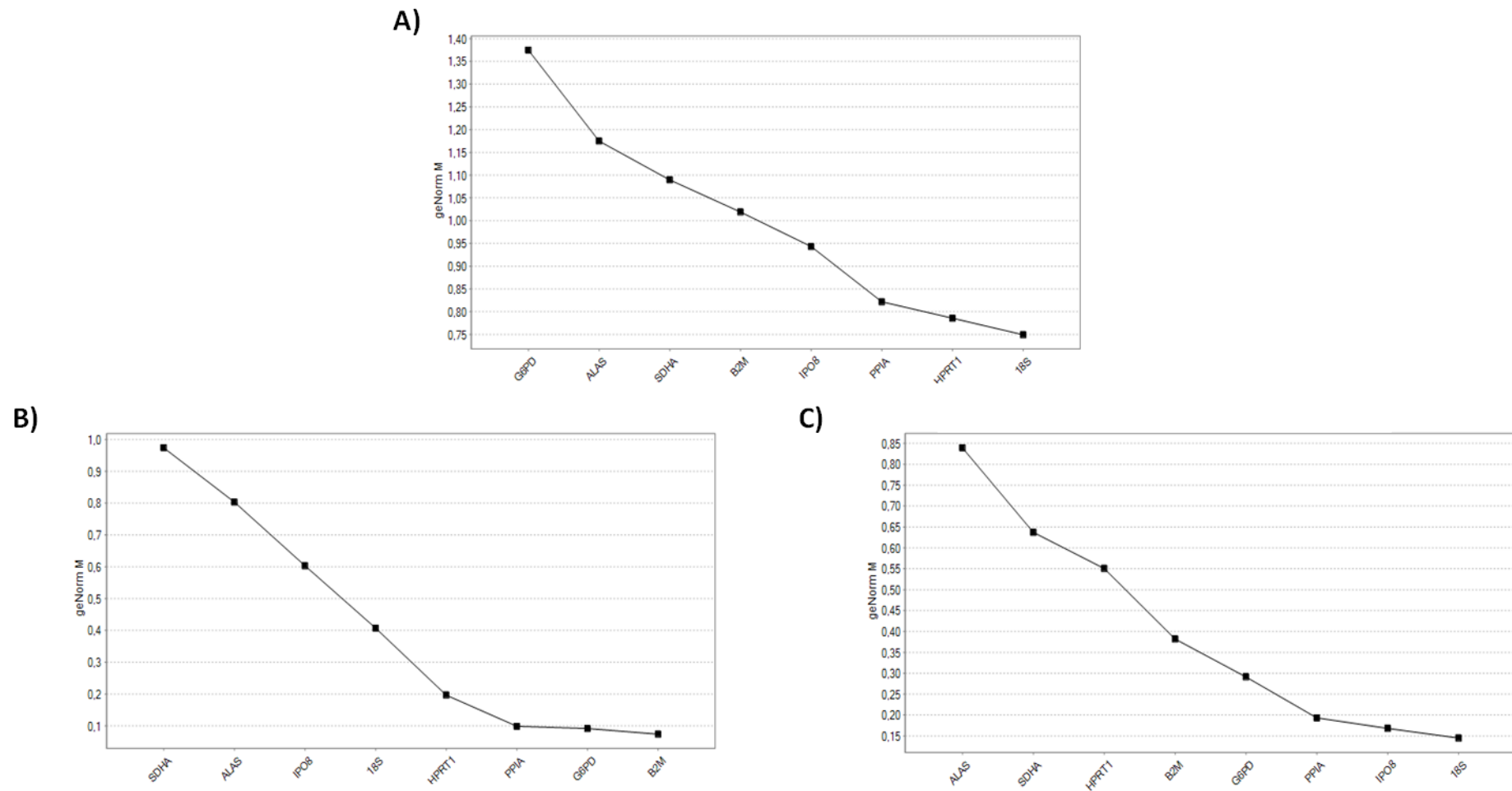


**Figura 13 - Análise da expressão de genes de referência nas linhagens celulares BT-549, Hs 578T e nas mamoesferas-derivadas.** Observa-se o perfil de expressão de cada gene entre as amostras estudadas. Legenda: RN18S1 - gene unidade ribossomal 18S; ALAS1 - gene aminolevulinato delta-sintase 1; B2M - gene  $\beta$ -2-microglobulina; G6PD - gene glucose-6-fosfato desidrogenase; HPRT1 - gene hipoxantina fosforibosil transferase 1; IPO8 - gene importina 8; PPIA - gene peptidilprolil isomerase A (ciclofina A); SDHA - gene complexo succinato desidrogenase, subunidade A.

Tabela 5 - Estabilidade da expressão gênica entre os grupos avaliados pelo *GeNorm*.

<b>Grupo de células</b>	<b>Genes</b>
BT-549/Hs578T/ Mamoefera-derivada BT-549/ Mamoefera-derivada Hs 578T	RN18S
BT-549/ Mamoefera-derivada BT-549	B2M, G6PD
Hs 578T/ Mamoefera-derivada Hs 578T	IPO8, RN18S

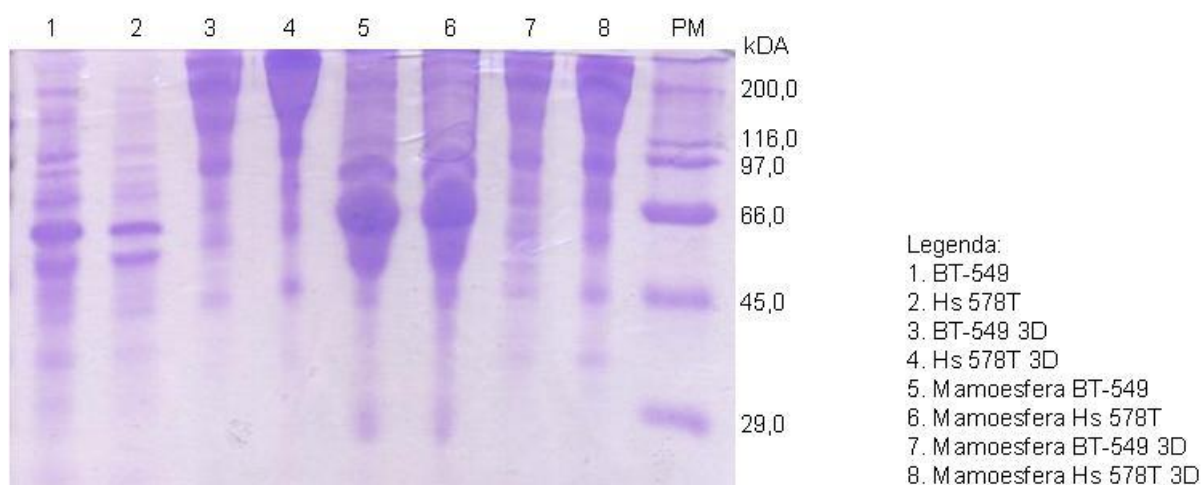
Esse ensaio não foi usado para determinar o gene de referência para subsequente normalização dos dados de expressão gênica relativa porque as amostras em 3D (linhagem celular e mamoesfera) não puderam ser analisadas devido ao baixo rendimento de RNA obtido. A proposta desse ensaio foi monitorar e avaliar possíveis mudanças na expressão desses genes e assim determinar se o controle transcricional de um grupo de genes pode ser usado como um sistema de controle rápido e confiável para caracterizar essas células. A análise de gene de referência feita indica genes que podem ser usados para garantir a qualidade das células-tronco/progenitoras isoladas a partir das linhagens celulares (Tabela 5).



**Figura 14 - Média da estabilidade da expressão gênica determinada pelo programa *GeNorm*.** A) Entre todas as amostras (BT-549/Hs578T/Mamoefera-derivada BT-549/Mamoefera-derivada Hs 578T); B) Entre BT-549/Mamoefera-derivada BT-549; C) Entre Hs 578T/ Mamoefera-derivada Hs 578T. A média da estabilidade de expressão foi muito alta em todas as análises, exceto entre o primeiro grupo.

## 6.2 Análise de expressão proteica

A acurácia da nossa curva padrão teve um índice de  $R^2$  de 0,997 com a concentração das proteínas entre 7,97 a 1,98 mg/mL. O perfil de proteínas obtidos das linhagens celulares e das mamoesferas-derivadas a partir delas e das mamoesferas cultivadas em 3D pode ser visualizada na Figura 11. Ambas as linhagens celulares apresentam 2 bandas proteicas mais proeminentes em torno de 45-66 kDa, sendo a da BT-549 de maior expressão. As suas respectivas mamoesferas-derivadas apresentam uma expressão ainda mais acentuada dessa proteína. Essas proteínas foram analisadas no espectrofotômetro de massa Maldi Tof na tentativa de identifica-las. A sequência encontrada foi avaliada no banco de dados Swiss Prot para análise de sua homologia. O resultado preliminar mostra uma proteína ainda não identificada para CSC's de mama. O próximo passo é analisar a expressão das proteínas HER-2, Ki-67, CK5, p-caderina e p63 por *western blott* para reforçar os nosso dados de expressão gênica.



**Figura 15 - Padrão eletroforético das proteínas isoladas das linhagens celulares, das mamoesferas-derivadas e das mamoesferas cultivadas em 3D em gel de poliacrilamida 15% corado com azul de comassie.**

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir:

- A linhagem celular Hs 578T apresentou maior capacidade de formar estruturas tridimensionais em Matrigel™ quando comparada a BT-549.
- O meio DMEM/F-12 (2) foi o de escolha para ensaios devido a capacidade de promover formação das mamoesferas em sistema 2D e de proporcionar a diferenciação das linhagens celulares em estruturas tridimensionais em sistema 3D (Matrigel™).
- A imunofenotipagem por citometria de fluxo classificou as linhagens celulares:
  - BT-549: CD90<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup>
  - Hs 578T: CD90<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup>
- Os genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* e *TP63* apresentam perfil de expressão diferenciado nas linhagens celulares BT-549 e Hs 578T quando cultivadas em sistema 3D (Matrigel™) em relação ao sistema 2D.
- Sob condições indiferenciadas por sete dias, as linhagens celulares BT-549 e Hs 578T formaram mamoesferas. A BT-549 apresentou melhor resultado caracterizando-se como melhor modelo de estudo *in vitro* para ensaios células-tronco/progenitoras.
- A análise de expressão dos genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* e *TP63* nas mamoesferas-derivadas em relação à linhagem parental sugere indícios da participação desses genes na formação das mamoesferas.
- Em cultura 3D, as mamoesferas parecem sofrer diferenciação e apresentam expressão diferencial dos genes *ERBB2*, *KRT5*, *MKI67*, *CDH3* e *TP63* em relação às mamoesferas.
- Os genes *ERBB2* e *TP63* se destacaram como potenciais marcadores das CSC`s.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem cada vez mais evidências, demonstradas por uma grande variedade de neoplasias, como câncer de mama, de que as CSC's sejam responsáveis pela tumorigênese, pela resistência do tumor às terapias convencionais e pela recidiva da doença.

No presente trabalho nós começamos a entender melhor as características biológicas e moleculares das linhagens celulares de câncer de mama BT-549 e Hs 578T e das células-tronco/progenitoras obtidas a partir delas. Padronizamos técnicas para futuramente trabalharmos com amostras tumorais humanas de câncer de mama. Destacamos os genes ERBB2 e TP63, devido a sua relação com a população de células-tronco, como potenciais marcadores das CSC's.

Estudo em modelos 2D *in vitro* fornecem um ambiente que difere significativamente do observado *in vivo*. Assim modelos de estudos 3D (Matrigel™), devido ao reestabelecimento da interação célula-matriz, são capazes de mimetizar as características do tecido *in vitro*, fornecendo assim um contexto fisiologicamente relevante para o estudo da biologia do câncer. O melhor conhecimento da participação das CSC's no processo de carcinogênese no câncer de mama poderá abrir novas perspectivas no diagnóstico e/ou no tratamento desta doença, na busca por novos biomarcadores, de novas drogas terapêuticas contra o câncer e na identificação de moléculas que permitam separar efetivamente as CSC's das células-tronco.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM B.K. *et al.* Prevalence of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res.*, v.11, n.3, p.1154-1159, 2005.
- ALISON M.R., LIM S.M, NICHOLSON L.J. Cancer stem cells: problems for therapy? *J Pathol.*, v.223, n.2, p.147-161, 2011.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer. Atlanta: American Cancer Society. 2012. Disponível em: < <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf>>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2013. Atlanta: American Cancer Society. 2013.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). Disponível em: <http://www.atcc.org/>
- AL-HAJJ M.; WICHA M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS*, v.100, n.7, p. 3983-3988, 2003.
- ALLRED D.C. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol.*, v.23, Suppl 2:S52-9, 2010.
- de AZAMBUJA E. *et al. et al.* Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British Journal of Cancer*, v.96, p.1504-1513, 2007.
- BAUM C.M. *et al.* Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 89, p.2804-2808, 1992.
- BAUMANN P. *et al.* CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res.*, v.65, n.23, p.10783-10793, 2005.
- BISSELL M.J.; HALL H.G., PARRY G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. theor. Biol.*, v.99, n.1, p.31-68, 1982.
- BISSELL M.J.; RADISKY D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*, v.1, n.1, p.46-54, 2001.
- BISSELL M.J. *et al.* The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*, v.70, p.537-546, 2002.
- BUNNELL B.A. *et al.* Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, v. 45, n.2, p.115-120, 2008.
- BURSTEIN H.J. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med.*, v.353, n.16, p.1652-1654, 2005.
- CAMPBELL L.L.; POLYAK K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle.*, v.6, n.19, p.2332-2338, 2007.
- CHARAFE-JAUFFRET E. *et al.* Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res.*, v.69, n.4, p.1302-1313, 2009.
- CHO R.W. *et al.* Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors. *Stem Cells*, v.26, p.364-371, 2008.



- CHUTE J.P. *et al.* Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.103, n.31, p.11707-11712, 2006.
- CLARKE M.F. *et al.* Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.*, v.66, n.19, p.9339-9344, 2006.
- COPPOCK H.A. *et al.* Cyclin-dependent kinase inhibitors and basement membrane interact to regulate breast epithelial celldifferentiation and acinar morphogenesis. *Cell Prolif.*, v.40, n.5, p.721-740, 2007.
- DEAN M., FOJO T., BATES S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, v.5, p.275-285, 2005.
- DEBNATH J. *et al.* The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressingmammary acini. *Cel*, v.111, n.1, p.29-40, 2002.
- DEBNATH J., MUTHUSWAMY S.K., BRUGGE J.S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*, v.30, n.3,p.256-268, 2003.
- DHILLON P.K. *et al.* Cytoplasmic expression of p63 and prostate cancer mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, v.18, p.595-600, 2009.
- DOMINICI M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, v.8, p.315-317, 2006.
- DONTU G. *et al.* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & Development*, v.17, p.1253-1270, 2003.
- DONTU G; Al-Hajj M *et al.* Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.*, v. 36, n.1, p.59-72, 2003.
- DU Z. *et al.* Overexpression of  $\Delta Np63\alpha$  induces a stem cell phenotype in MCF7 breast carcinoma cell line through the Notch pathway. *Cancer Sci.*, v.101, n.11, p.2417-24, 2010.
- DYLLA S.J., BEVIGLIA L., PARK I.K. *et al.* Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One*, v.3, e2428, 2008.
- FASCHING P.A. *et al.* Ki67 chemotherapy response and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*, v.11, p.48, 2011.
- FITZGIBBONS P.L. *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol Lab Med.*, v.124, p.966-978, 2000.
- FOGEL M. *et al.* CD24 is a marker for human breast carcinoma. *Cancer Letters*, v.143, p.87-94, 1999.
- FOURNIER M.V. *et al.* Gene expression signature in organized and growth-arrested mammary acini predicts good outcome in breast cancer. *Cancer Res.*, v.66, n.14, p.7095-7102, 2006.
- GAMALLO C. *et al.* The prognostic significance of P-cadherin in infiltrating ductal breast carcinoma. *Mod Pathol.*, v.14, n.7, p.650-654. 2001.
- GERDES J. *et al.* Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.*, v.133, n.4, p.1710-1715, 1984.

GINESTIER C. *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, v.1, n.5, p.555-567, 2007.

GLOBOCAN, 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>.

GRESSNER O. *et al.* TAp63a induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.*, v.24, p.2458-2471, 2005.

HANAHAHAN D., WEINBERG R.A. The hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v.144, p.646-674, 2011.

HANKER L. *et al.* Clinical relevance of the putative stem cell marker p63 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, v.122, p.765-775, 2010.

HE J. *et al.* CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics*, v.11, n.6, M111.010744, 2012.

HEPPNER G.H., MILLER B.E. Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev.*, v.2, n.1, p.5-23, 1983.

HIGASHIKAWA K. *et al.* Snail-induced down-regulation of deltaNp63alpha acquires invasive phenotype of human squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, v.67, n.19, p.9207-9213, 2007.

IGNEY F.H., KRAMMER P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. v.2, n.4, p.277-288, 2002.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESEARCH (ISSCR). Stem Cell Facts. 2011. Disponível em: <[http://www.isscr.org/docs/default-source/isscr-publications/isscr\\_11\\_stemcellfactbrch\\_fnl.pdf](http://www.isscr.org/docs/default-source/isscr-publications/isscr_11_stemcellfactbrch_fnl.pdf)>.

JACKS T., WEINBERG R.A. Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. *Cell*, v.111, n.7, p.923-925, 2002.

JORDAN M.A., WILSON L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev Cancer*, v.4, n.4, p. 253-265, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2012 - Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>.

KAO J. *et al.* Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One*, v.4, n.7, p.1-16, 2009.

KAKARALA M., WICHA M.S. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *Journal of Clinical Oncology*, v.26, n.17, p.2813-2820, 2008.

KARANTZA, V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*, v.30, n.2, p.127-138, 2011.

KASS L. *et al.* Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol.*, v.39, n.11, p.1987-1994, 2007.

KIM J.B. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol.*, v.15, n.5, p.365-77, 2005.

- KENNY P.A. *et al.* The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol.*, v.1, n.1, p.84–96, 2007.
- KORKAYA H. *et al.* HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*, v.27, n.47, p.6120-6230, 2008.
- KRISTIANSEN G. *et al.* CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *American Journal of Pathology*, v.161, n.4, p.1215-1221, 2002.
- KRISTIANSEN G. *et al.* CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *British Journal of Cancer*, v.88, p.231-236, 2003.
- KRISTIANSEN G. *et al.* CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *The Prostate*, v.58, p.183-192, 2004.
- LABELLE M. *et al.* Vascular endothelial cadherin promotes breast cancer progression via transforming growth factor  $\beta$  signaling. *Cancer Res.*, v.68, p.1388-1397, 2008.
- LACROIX M., LECLERCQ G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.*, v.83, n.3, p.249-89, 2004.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
- LAN K.H., LU C.H., YU D. Mechanisms of trastuzumab resistance and their clinical implications. *Ann N Y Acad Sci.*, v.1059, p.70-5, 2005.
- LEE G.Y. *et al.* Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods.*, v.4, n.4, p.359–365, 2007.
- LEE H.E. *et al.* An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *British Journal of Cancer*, v.104, p.1730-1738, 2011.
- LEVINA V. *et al.* Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS One*, v.3, e3077, 2008.
- LI C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* v.67, p.1030–1037, 2007.
- LI X. *et al.* Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *JNCI.*, v.100, n.9, p.672-679, 2008.
- LI Y.L. *et al.* Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem.*, v.394, p.110-116, 2009.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, v. 25, p.402-408, 2001.
- LU C. *et al.* Tap63 $\alpha$  mediates chemotherapeutic agent-induced apoptosis in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, v.20, n.8, p.1319-1326, 2011.
- MAGNIFICO A. *et al.* Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clin Cancer Res.*, v.15, n.6, p.2010-2021, 2009.
- MANI S.A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.*, v.133, n.4, p.704-715, 2008.

- MARTIN K.J. *et al.* Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets. *PLoS One*, v.3, n.8, e2994, 2008.
- MASSION P.P. *et al.* Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res.*, v.63, n.21, p.7113-7121, 2003.
- MATOS I. *et al.* p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinoma. *Virchows Arch.*, v.447, p.688-694, 2005.
- MILLAR E.K. *et al.* Prediction of outcome of early ER+ breast cancer is improved using a biomarker panel, which includes Ki-67 and p53. *Br J Cancer.*, v.105, n.2, p.272-280, 2011.
- MOLL R.; DIVO M.; LANGBEIN L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* v.129: p.705-733, 2008.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>>.
- NEKULOVA M. *et al.* The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. *Cell Mol Biol Lett.*, v.16, n.2, p.296-327, 2011.
- NEVE R.M. *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.*, v.10, n.6, p.515-527, 2006.
- O'BRIEN L.E.; ZEGERS M.M.; MOTOV K.E. Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v.3, n.7, p.531-537, 2002.
- O'BRIEN C.A. *et al.* A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, v.445, p.106–110, 2007.
- PAREDES J. *et al.* P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res.*, v.11, p.5869-5877, 2005.
- PARK C.C. *et al.* Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res.*, v.66, n.3, p.1526-1535, 2006.
- PASQUIER E., KAVALLARIS M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life*, v.60, n.3, p.165–170, 2008.
- PAYNE S.J. *et al.* Predictive markers in breast cancer - the present. *Histopathology*, v.52, n.1, p.82-90, 2008.
- PETERSEN O.W. *et al.* Interaction with basement membrane to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.89, p.9064–9068, 1992.
- PEROU C.M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, v.406, n.6797, p.747-752, 2000.
- PHILLIPS T.M., MCBRIDE W.H., PAJONK F. The response of CD24<sup>-/low</sup>/CD44<sup>+</sup> breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute*, v.98, n.24, p.1777-1785, 2006.
- PICKL M., RIES C.H. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene*, v.28, n.3, p.461-468.

2009.

PONTI D. *et al.* Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, v.65, p.5506-5511, 2005.

PRINCE M.E. *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.104, n.3, p.973-978, 2007.

RAPPA G.; LORICO A. Phenotypic characterization of mammosphere-forming cells from the human MA-11 breast carcinoma cell line. *Exp Cell Res*, v.316, n.9, p.1576-1586, 2010.

REYA T. *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, v.414, n.6859, p.105-111, 2001.

REYNOLDS B.A.; WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, v.255, n.5052, p.1707-1710, 1992.

ROMANO R.A. *et al.* An active role of the DeltaN isoform of p63 in regulating basal keratin genes K5 and K14 and directing epidermal cell fate. *PLoS One*, v.4, n.5, e5623, 2009.

SCHINDELMANN S. *et al.* Expression profiling of mammary carcinoma cell lines: correlation of in vitro invasiveness with expression of CD24. *Tumour Biol*, v.23, p.139-145, 2002.

SENOO M. *et al.* p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell*, v.129, n.3, p.523-536, 2007.

SHIMOYAMA Y. *et al.* Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.*, v.49, n.8, p.2128-33. 1989.

SHAW F.L. *et al.* A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v.17, n.2, p.111-117, 2012.

SINGH S.K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, v.432, p.396-401, 2004.

SLÁDEK N.E. *et al.* Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.49, n.4, p.309-21, 2002.

SLAMON D.J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, v.235, p.177-182, 1987.

SLAMON D.J. *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.*, v.344, p.783-792, 2001.

SOPHOS N.A.; VASILIOU V. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact*, v.143-144, p.5-22, 2003.

SØRLIE T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.98, n.19, p.10869-10874. 2001.

STEFANOU D. *et al.* p63 expression in benign and malignant breast lesions. *Histol Histopathol*.v.19, n. 2, p.465-471. 2004.

TAIPALE J., BEACHY .AB. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, v.411, n.6835, p.349-54, 2001.

- TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. *et al.* Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *Journal of Cell Science*, v.94, n.403-413, 1989.
- VARGO-GOGOLA T.; ROSEN J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer*, v.7, n.9, p.659-672, 2007.
- VIEIRA A.F. *et al.* P-cadherin is coexpressed with CD44 and CD49f and mediates stem cell properties in basal-like breast cancer. *Stem Cells*, v.30, n.5, p.854-864, 2012.
- VISVADER J.E., LINDEMAN G.J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat rev cancer*, v.8, p.755-768, 2008.
- VISVADER J.E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev*, v.23, n.22, p.2563-2577, 2009.
- VISVADER J.E. Cells of origin in cancer. *Nature*, v.469, p.314-322, 2011.
- WEAVER V.M. *et al.* beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*, v.2, p.205-216, 2002.
- WEIGELT B.; BISSELL M.J. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. *Semin Cancer Biol*, v.18, n.5, p.311-321, 2008.
- WEIGELT B. *et al.* HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat.*, v.122, n.1, p.35-43, 2010.
- WERLING R.W. *et al.* Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol.*, v.27, n.1, p.82-90, 2003.
- WILKEN J.A., MAIHLE N.J. Primary trastuzumab resistance: new tricks for an old drug. *Ann N Y Acad Sci.*, v.1210, p.53-65, 2010.
- WOLFF A.C. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.*, v.25, n.1, p.118-145, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global status report on noncommunicable diseases. 2010.
- WU J.C.; GREGORY C.W.; DEPHILIP R.M. P-cadherin and E-cadherin are co-expressed in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* v.195, n.3, p.1329-1335, 1993.
- YANG A. *et al.* p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell.*, v.2, n.3, p.305-316, 1998.
- YANG A. *et al.* p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, v.398, p.714-718, 1999.
- YANG A. *et al.* Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells. *Mol Cell.*, v.24, n.4, p.593-602, 2006.

YANG Z.F. *et al.* Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*, v.13:, p.153-166, 2008.

YARDEN Y.; SLIWKOWSKI M.X. Untangling the erbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biology*, v.2, n.127-137, 2001.

YU M. *et al.* Expression profiling during mammary epithelial cell three-dimensional morphogenesis identifies PTPRO as a novel regulator of morphogenesis and ErbB2-mediated transformation. *Mol Cell Biol*, v.32, n.19, 3913-24, 2012.

ZABOUO G. *et al.* CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research.*, v.11, n.1, p.1-14, 2009.

ZENG Q. *et al.* CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer. *PNAS*, v.109, n.4, p.1127-1132, 2012.

ZHOU B.B. *et al.* Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discovery*, v.8, p.807-823, 2009.

ZOHAR R. *et al.* Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J Cell Physiol*, v.184, p.118-130, 2000.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1 - Comprovação de submissão de artigo

Elsevier Editorial System(tm) for Tissue and Cell  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: In vitro three-dimensional microenvironment induces differential gene expression of breast cancer biomarkers

Article Type: Full Length Article

Keywords: three-dimensional culture; breast cancer; cell lines; gene expression; Matrigel™.

Corresponding Author: Mrs. Milene Pereira Moreira,

Corresponding Author's Institution: Ezequiel Dias Foundation

First Author: Milene Pereira Moreira

Order of Authors: Milene Pereira Moreira; Geovanni D Cassali, PhD; Luciana M Silva, PhD

**Abstract:** The in vitro three-dimensional (3D) culture has an invaluable role in the study of cell biology because it can provide a more physiologic microenvironment than the conventional models of two-dimensional (2D) culture, much more similar to that observed in vivo. Therefore, the present study aimed to assess the expression of important breast cancer biomarkers in breast cancer cell lines (BT-549 and Hs 578T) in these two types of culture (plastic substrate X Matrigel™). The relative gene expression levels of the genes ERBB2, KRT5, MKI67, CDH3 and TP63 were obtained by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results showed a differential expression of those genes when the monolayer cell lines were cultured in Matrigel™, a basement membrane matrix extracted from the Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse tumour rich in extracellular matrix proteins that is effective in cell growth and differentiation. The analysis of the genes ERBB2, KRT5, MKI67, CDH3 and TP63 provides cues of their expression in Matrigel™ for the study of cell and molecular biology. We highlight the genes ERBB2 and TP63 that emerge like promising markers of cancer stem cell. These findings offer a better understanding of the biology of the breast cancer cell lines analyzed for further utilize these models in drug cancer cytotoxicity assays.



**Anexo 2 - Declaração de aprovação**

**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
[cpg@medicina.ufmg.br](mailto:cpg@medicina.ufmg.br)



UFMG

**DECLARAÇÃO**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Luciana Maria Silva, Geovanni Dantas Cassali, Dawidson Assis Gomes e Leticia da Conceição Braga, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS A PARTIR DE CULTIVO IN VITRO DE LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA DE MAMA HUMANA”**, apresentada pela mestrande **MILENE PEREIRA MOREIRA**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Investigativa, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 08 de março de 2013.

  
Prof. Luciana Maria Silva  
Orientadora

  
Prof. Geovanni Dantas Cassali  
Coorientador

  
Prof. Dawidson Assis Gomes

  
Prof. Leticia da Conceição Braga

Prof. Rosa Maria Esteve Arantes  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Patologia  
Faculdade de Medicina / UFMG

## Anexo 3 - Ata da defesa



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640  
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **MILENE PEREIRA MOREIRA**, nº de registro 2011655905. Às quatorze horas do dia **08 de março de dois mil e treze**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS A PARTIR DE CULTIVO IN VITRO DE LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA DE MAMA HUMANA”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Investigativa. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Luciana Maria Silva, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Luciana Maria Silva/Orientadora	Instituição: FUNED	Indicação: <u>aprovada</u>
Profa. Giovanni Dantas Cassali/Coorientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Dawidson Assis Gomes	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Leticia da Conceição Braga	Instituição: Centro Universitário UNA	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 08 de março de 2013.

Profa. Luciana Maria Silva Luciana Maria Silva

Prof. Giovanni Dantas Cassali Giovanni Dantas Cassali

Prof. Dawidson Assis Gomes Dawidson A. Gomes

Profa. Letícia da Conceição Braga Letícia da Conceição Braga

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes (Coordenadora) Rosa Maria Esteves Arantes

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Patologia  
Faculdade de Medicina / UFMG